



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**“USO DE DISTINTOS SUSTRATOS PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA  
BACTERIANA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Previa a la obtención del título de:**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS PECUARIAS**

**AUTOR:**

**GEOVANNY DAVID YÁNEZ TISALEMA**

**Riobamba – Ecuador**

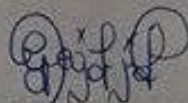
**2016**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Geovanny David Yáñez Tisalema, declaro que el presente trabajo de titulación "USO DE DISTINTOS SUSTRATOS PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA" es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como Autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.


Riobamba, 19 de agosto de 2016.



Geovanny David Yáñez Tisalema

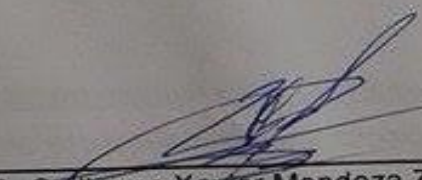
C.I.: 050390716-4

El presente trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente tribunal



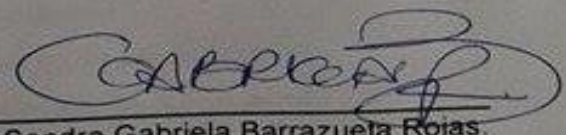
---

Ing. M.C. César Iván Flores Mancheno.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



---

Ing. M.C. Guillermo Xavier Mendoza Zurita.  
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**



---

Ing. M.C. Sandra Gabriela Barraqueta Rojas.  
**ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Riobamba, 19 de Agosto del 2016.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios quien me ha bendecido en cada uno de mis pasos y porque me ha dado salud para cumplir con mis objetivos. También a mi madre Hortensia y mis hermanos Lourdes, Silvia y Patricio por apoyarme económica y moralmente para cursar la carrera y la realización de este trabajo investigativo. A mis sobrinos Salatiel, Jhon, Damaris y Noemí, que siempre me han visto con admiración y como un ejemplo a seguir. A mis primos Carmita y Jimmy por preocuparse y estar pendientes durante todo el proceso de mi vida profesional, A mi amiga Lisseth por brindarme su amistad sincera e incondicional y profesores que día a día han impartido sus valiosos conocimientos.

Geovanny Y.

## **DEDICATORIA**

A mi madre Hortensia, quien es el pilar fundamental de mi vida, quien ha sido padre y madre para mí, y siempre me ha brindado su amor y comprensión y sobre todo por sus oraciones que me han permitido ir por el camino del bien y me han protegido siempre.

De manera muy especial quiero también dedicar este trabajo de titulación a mi querida hermana Lourdes por brindarme siempre su apoyo incondicional y por creer en mi capacidad de superación para cumplir con este sueño.

Geovanny Y.

## CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Gráficos	viii
Lista de Anexos	ix
<b>I. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u></b>	<b>3</b>
A. LOS PROBIÓTICOS	3
1. <u>Definición</u>	3
2. <u>Historia</u>	3
3. <u>Requisitos que deben cumplir los Probióticos</u>	4
a. Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento del alimento	5
b. Estabilidad frente a ácidos gástricos y bilis.	5
c. Adherencia a la mucosa intestinal	5
d. Producción de sustancias antimicrobianas	6
4. <u>Nomenclatura para los microorganismos probióticos</u>	6
5. <u>Principales microorganismos usados como probióticos</u>	6
6. <u>Lactobacilos</u>	9
a. Especies de lactobacilos	9
b. Características del cultivo y colonias	10
c. Nutrición y condiciones de crecimiento	11
d. Condiciones ecológicas	12
e. Plásmidos	14
f. Estructura antigénica	14
g. Fagos	15
h. Sensibilidad a antibióticos y drogas	15
i. Patogenicidad	15
7. <u>Lactobacillus casei</u>	16
a. Características Generales	16

b. Taxonomía	16
c. Requerimientos nutricionales y micronutrientes para L. casei	17
d. Transporte y metabolismo de la lactosa en Lactobacillus casei	18
e. Factores que afectan el crecimiento de Lactobacillus casei	19
f. Fuente, aislamiento y conservación de Lactobacillus casei	19
B. BENEFICIOS Y APLICACIONES DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS	21
1. <u>Beneficios de los probióticos en la salud humana</u>	21
a. Facilitan la digestibilidad de la lactosa	21
b. Protegen contra enfermedades gastrointestinales.	21
c. Protegen contra infecciones del tracto urogenital.	22
d. Promueven la barrera de defensa endógena del intestino.	22
e. Protegen contra infecciones respiratorias	22
f. Previenen el eczema	23
g. Previenen la infección en heridas quirúrgicas	23
2. <u>Desarrollo de alimentos funcionales</u>	23
a. Probióticos en alimentos no lácteos	24
b. Alimentos con múltiples cepas probióticas	24
c. Alimentos con probióticos dirigidos a consumidores específicos:	25
d. Alimentos con cepas probióticas modificadas	25
3. <u>Biopreservación</u>	25
C. SUSTRATOS	26
1. <u>Definición</u>	26
2. <u>Sustratos en Microbiología Industrial</u>	26
3. <u>Sustratos usados como fuentes de carbono</u>	27
a. Extracto de malta	27
b. Almidón y dextrinas	28
c. Desechos de madera e industrias papeleras	28
d. Aceites vegetales	28
e. Alcoholes de bajo número de carbonos	28
f. Alcanos de 12 a 18 carbonos	28
4. <u>Sustratos usados como fuentes de nitrógeno</u>	29
a. Extracto de levadura	29
b. Peptonas	29
c. Harina de soja	29

d. Líquidos de maceración del maíz	29
5. <u>Melaza</u>	29
6. <u>Lactosuero</u>	31
a. Lactosuero dulce	31
b. Lactosuero ácido	31
D. MEDIOS DE CULTIVO	32
1. <u>Tipos de medio de cultivo</u>	33
2. <u>Biorreactores</u>	33
3. <u>Modos de operación de un biorreactor:</u>	34
a. Discontinuo o reactor en Batch	34
b. Semicontinuo	34
c. Continuo.	34
4. <u>Crecimiento microbiano en medio líquido</u>	35
a. Fase Lag o de adaptación	35
b. Fase exponencial o logarítmica	35
c. Fase estacionaria	36
d. Fase de muerte	36
<b>III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	38
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	38
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	38
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	38
1. <u>Instalaciones</u>	38
2. <u>Equipos y materiales de Laboratorio.</u>	38
3. <u>Materia prima e insumos</u>	39
D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	40
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	40
1. <u>Variables Microbiológicas</u>	40
2. <u>Variables económicas</u>	41
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	41
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	41
1. <u>Formulación de los sustratos</u>	41
2. <u>Preparación de los biorreactores a escala de laboratorio</u>	42
3. <u>Siembra en cajas Petri</u>	43



4. <u>Recuento</u>	43
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	43
1. <u>Determinación de la velocidad específica de crecimiento (<math>\mu</math>)</u>	43
2. <u>Determinación de la viabilidad de <i>L. casei</i> (Log UFC/ml)</u>	45
3. <u>Determinación de rendimiento de biomasa Y(X/S)</u>	46
<b>IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	<b>47</b>
A. EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ ) DE <i>L. casei</i> , AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS (MELAZA Y LACTOSUERO) Y CONDICIONES (AGITACIÓN Y ESTÁTICO) PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA	47
B. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE <i>L. casei</i> (LOG UFC/ML), AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS (MELAZA Y LACTOSUERO) Y CONDICIONES (AGITACIÓN Y ESTÁTICO) PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA	52
C. EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO DE BIOMASA Y(X/S) DE <i>L. casei</i> AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS (MELAZA Y LACTOSUERO) Y CONDICIONES (AGITACIÓN Y ESTÁTICO) PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA	56
D. ANÁLISIS ECONÓMICO	59
<b>V. <u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>62</b>
<b>VI. <u>RECOMENDACIONES</u></b>	<b>63</b>
<b>VII. <u>LITERATURA CITADA</u></b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS</b>	

## RESUMEN

En la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se evaluó el efecto de distintos sustratos (melaza y lactosuero) y condiciones de cultivo (agitación y estático), para el desarrollo de biomasa bacteriana de *Lactobacillus casei*, utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y una temperatura de experimentación de 34 – 36°C. Los resultados fueron analizados mediante separación de medias según Friedman ( $P < 0,05$ ), Estableciendo el efecto de los sustratos y condiciones sobre la velocidad específica de crecimiento, viabilidad, rendimiento de biomasa e indicador beneficio/costo, siendo el tratamiento con melaza en agitación (MA) el que presentó la mayor velocidad específica de crecimiento ( $0,087\text{h}^{-1}$ ), sin embargo, el crecimiento en este tratamiento se vio afectado por el sustrato limitante (fosfato de amonio), lo que condujo a recuentos de células viables ( $6,66\text{ Log UFC/ml}$ ) y rendimientos de biomasa ( $0,11\text{ g.g}^{-1}$ ) bajos, en comparación con el tratamiento con lactosuero en agitación (LA), mismo que permitió obtener los mayores valores de viabilidad y rendimiento de biomasa ( $7,86\text{ Log UFC/ml}$  y  $0,26\text{ g.g}^{-1}$ ) con una velocidad específica de crecimiento de  $0,052\text{ h}^{-1}$ , además es el tratamiento más rentable ya que registró un beneficio/costo de 0,63 centavos por cada dólar invertido. Los resultados obtenidos demuestran la eficacia del uso del lactosuero como sustrato para la producción de biomasa bacteriana y la condición de agitación como la ideal para el desarrollo de los microorganismos.

Palabras clave: sustrato, biomasa.

## ABSTRACT

In the Faculty of Animal Science at the Polytechnic School of Chimborazo, the effect of different substrates (molasses and whey) and culture conditions (agitation and static) were evaluated for the development of bacterial biomass of *Lactobacillus casei*, using ammonium phosphate as nitrogen source and a temperature of experimental of 34 – 36°C. The results were analyzed using mean separation according Friedman ( $P < 0.05$ ). Setting the effect of the substrates and conditions on the specific growth rate, viability, biomass yield and indicator benefit/cost, being the treatment with stirring molasses (MA) which had the highest specific growth rate ( $0,087\text{h}^{-1}$ ) however, the growth in this treatment was affected by limiting substrate (ammonium phosphate), which led to viable cell counts (6,66 Log CFU/ml) and biomass yields ( $0,11\text{ g.g}^{-1}$ ) low, compared to treatment with whey agitation (LA), same that yielded the highest values of viability and biomass yield ( $7,86\text{ Log CFU/ml}$  y  $0,26\text{ g.g}^{-1}$ ) with a specific growth rate of  $0,052\text{ h}^{-1}$ , it is also the most cost – effective treatment as it recorder a beneficial/cost of 0,063 cents for every dollar invested. The results demonstrate the effectiveness of using whey as a substrate for the production of bacterial biomass and stirring condition as the ideal for the development of microorganisms

Key words: substrate, biomass.

**LISTA DE CUADROS**

Nº		Pág.
1	ESPECIES BACTERIANAS EMPLEADAS COMO PROBIÓTICOS.	8
2	TAXONOMÍA DE <i>Lactobacillus casei</i> .	17
3	COMPOSICIÓN DE LA MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR.	30
4	COMPOSICIÓN DE LOS LACTOSUEROS DULCE Y ÁCIDO.	32
5	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	40
6	FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MELAZA Y LACTOSUERO.	42
7	COMPORTAMIENTO DE <i>L. casei</i> AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS Y CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA.	49
8	ANÁLISIS ECONÓMICO DEL USO DE DISTINTOS SUSTRATOS PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA.	60

## LISTA DE GRÁFICOS

Nº		Pág.
1	Metabolismo de la lactosa. Rutas de Leloir (izquierda) y de la Tagatosa-6P (derecha).	19
2	Fases de crecimiento bacteriano en un cultivo discontinuo o Batch.	36
3	Velocidad específica de crecimiento de <i>L. casei</i> , frente a los diferentes tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA).	48
4	Viabilidad de <i>L. casei</i> , frente a los diferentes tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA).	53
5	Rendimiento de biomasa probiótica $Y_{x/s}$ (g de biomasa/g de sustrato)de <i>L. casei</i> , frente a los distintos tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA).	57

## LISTA DE ANEXOS

Nº

- 1 Velocidad específica de crecimiento  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de *L. casei* al usar distintos sustratos y condiciones.
- 2 Viabilidad (Log UFC/ml) de *L. casei* al usar distintos sustratos y condiciones.
- 3 Rendimiento de biomasa Y (X/S) de *L. casei* al usar distintos sustratos y condiciones.
- 4 Comportamiento del pH de los tratamientos a través del tiempo, medido en muestras tomadas cada 24 horas.
- 5 Recuentos de *L. casei* (Log UFC/ml) de cada tratamiento a través del tiempo, medido en muestras tomadas cada 24 horas.
- 6 Gráficos de pendientes de la curva de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento de *L. casei*.
- 7 Histogramas de frecuencia que muestran la no normalidad de los datos de cada variable de estudio, obtenidos mediante el programa estadístico Infostat Version Libre 2016.
- 8 Costos de producción del uso de distintos sustratos para el desarrollo de biomasa bacteriana, proyectados para un año, a escala piloto (50 Lt de medio de cultivo).

## I. INTRODUCCIÓN

Según la FAO (2002), los probióticos son “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas”. Dentro de los microorganismos probióticos se encuentran los *Lactobacillus spp.*, los cuales son bacterias ácido lácticas (BAL) que se caracterizan por los diferentes usos e importancia a nivel industrial y, en ocasiones, utilizadas como fermentadores de alimentos cárnicos, lácteos y vegetales, además del uso en biopreservación, para incrementar la vida útil de los productos o como potencial probiótico en la industria (Silveira, M. *et al.*, 2003).

Desde el siglo pasado estos microorganismos han demostrado múltiples efectos positivos en la salud de animales y del hombre. Así pues, se han demostrado los efectos beneficiosos utilizando *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium lactis* BB-12 con fines de prevención de la diarrea aguda, causada principalmente por rotavirus en niños (Holzapfel, W., 2010).

Jiménez, R.*et al.* (2009), manifiestan que la aplicación de los probióticos en el mejoramiento de la salud, conservación de alimentos y producción animal ha generado la necesidad de contar con los sustratos disponibles para su producción. Los medios tradicionalmente usados en el cultivo de biomasa probiótica son complejos, de costos elevados y difíciles de adquirir. La búsqueda de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas densidades de microorganismos ( $>10^6$ UFC/ml), ha sido la meta de muchas empresas, que están interesadas en las bacterias ácido lácticas, no sólo como microorganismos iniciadores, sino también como un ingrediente o aditivo probiótico para aumentar el valor nutritivo de sus productos.

Sin embargo, aunque el uso de probióticos en diversos sectores es amplio, en la actualidad solo existen medios comerciales de cultivo orientados a su aislamiento e identificación, como el medio MRS (MAN, J. ROGOSA, M. Y. SHARPE, E., 1990), Rogosa (Tamime, A. *et al.*, 1995) y LAMVAB (Hartemink, R.*et al.*, 1997).

La melaza de caña de azúcar en su composición presenta un 80% de azúcares principalmente sacarosa (Gilces, P. y Veloz, P., 2006), y el lactosuero dulce

ofrece de 4,5 a 5% de lactosa (Chamorro, M y Losada, M., 2002); estos azúcares constituyen una fuente de carbono para muchos seres vivos, por lo que la melaza y el lactosuero podrían convertirse en sustratos ideales para el desarrollo de biomasa bacteriana.

Por lo anotado en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Establecer la velocidad específica de crecimiento de *Lactobacillus casei* dentro de cada sustrato (lactosuero y melaza de caña de azúcar).
- Determinar la viabilidad de *L. casei* al emplear sustratos naturales como medio de cultivo (lactosuero y melaza de caña de azúcar).
- Evaluar el rendimiento de biomasa probiótica de *L. casei* en cada uno de los sustratos (lactosuero y melaza de caña de azúcar).
- Evaluar los costos de obtención (indicador beneficio/costo) de biomasa bacteriana con uso de distintos sustratos.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. LOS PROBIÓTICOS

#### 1. Definición

El concepto de probióticos, se puede definir como: “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino” (Fuller, R., 2012).

Lyons, P. (1997) ha denominado probióticos a los productos naturales que son utilizados como promotores del crecimiento en los animales, de tal manera que su empleo permita obtener mayores rendimientos, elevada resistencia inmunológica, reducida o ninguna cantidad de patógenos en el tracto gastrointestinal y menores residuos de antibióticos u otras sustancias. Esta definición no sólo enfatiza la importancia del uso de los microorganismos probióticos en el mejoramiento de las propiedades de la microflora autóctona de los animales, sino que incluye otros efectos tales como: la promoción del crecimiento, la estimulación de la actividad inmunológica y la acción antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

#### 2. Historia

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (un científico ruso galardonado con el premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur de París) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) conferirían beneficios a la salud capaces de promover la longevidad. Sugería que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la flora intestinal y reemplazando los microbios proteolíticos tales como *Clostridium* (que producen sustancias tóxicas, entre las que se encuentran los fenoles, indoles y amoníaco a partir de la digestión de proteínas) por microbios útiles. Desarrolló una dieta con leche fermentada con la bacteria que denominó “*Bulgarian Bacillus*” (Olagnier, G. *et al.*, 2007). En 1917, antes de que Alexander Fleming descubriera la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* a partir de heces de

un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote severo de shigellosis. Los trastornos del tracto intestinal frecuentemente eran tratados con bacterias no patógenas viables, con el fin de modificar o reemplazar la flora intestinal (Guarner, F. *et al.*, 2011).

Guarner, F. *et al.* (2011) afirma que el primero en aislar una bífidobacteria fue Henry Tissier (del Instituto Pasteur), quien la obtuvo de un lactante alimentado a pecho, y le dio el nombre de bacteria *Bacillus bifidus communis*. Tissier postulaba que las bífidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan diarrea y recomendaba la administración de bífidobacterias a los lactantes que sufrían de estos síntomas.

El término “probióticos” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos (sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias), los prebióticos fueron definidos como una clase de alimentos funcionales, definidos como: “Ingredientes no digeribles que benefician al organismo, mediante el crecimiento y/o actividad de una o varias bacterias en el colon, mejorando la salud”. En 1989, Roy Fuller destacó el hecho que para considerarse probiótico, el microorganismo en cuestión debía estar presente en estado viable, e introdujo la idea de su efecto beneficioso sobre el huésped (Olagnero, G. *et al.*, 2007).

### **3. Requisitos que deben cumplir los Probióticos**

Las cepas de microorganismos probióticos deben presentar y mantener unas características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el alimento que lo contiene o al que se adiciona, como también durante su tránsito a través del estómago e intestino delgado, y su capacidad de adherirse a las mucosas del intestino grueso (Salazar, B. Y Montoya, O., 2003).

Entre los principales criterios que deben cumplir los probióticos se encuentran:

### **a. Viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento del alimento**

Nava, J. (2008) afirma que la viabilidad es la capacidad que tienen estos microorganismos de permanecer vivos, tanto en el alimento como en el intestino del consumidor durante un tiempo determinado, con el fin de lograr los beneficios de dichos alimentos. La viabilidad está relacionada con el método de producción y con el microorganismo adicionado al producto fermentado. En general se exige que las leches fermentadas con probióticos deben presentar una viabilidad en Unidades Formadoras Colonias (UFC) de concentraciones no menores de  $10^6$  UFC/g durante un período mínimo de 21 días.

La viabilidad y actividad adecuadas de los probióticos son consideradas prerrequisitos para la óptima funcionalidad. Sin embargo, algunas cepas pueden también causar efectos benéficos para el huésped, aún sin llegar viables. En esos casos particulares, sería suficiente garantizar una propagación eficiente de modo de contar con concentraciones elevadas en el producto, aunque luego no retengan su viabilidad durante el almacenamiento.

### **b. Estabilidad frente a ácidos gástricos y bilis.**

Estos microorganismos deben de resistir las concentraciones de ácido y sales biliares del estómago o intestino delgado de los seres humanos y animales. Para comprobar la resistencia a estos medios adversos existe una prueba que se realiza in vitro a un pH de 2 y con sales biliares a una concentración de 0.3% p/v; porque no todas las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan esta característica, por lo tanto, es un criterio importante para seleccionar un microorganismo probiótico (Salazar, B. Y Montoya, O., 2003).

### **c. Adherencia a la mucosa intestinal**

Los microorganismos probióticos tienen la capacidad de sintetizar un biosurfactante de composición glicoprotéica, el cual favorece la adhesión a la mucosa del tracto gastrointestinal, y de esta manera compiten con los microorganismos enteropatógenos e impiden que éstos colonicen el intestino, lo

que conlleva en última instancia a estimular el sistema inmunológico, presentándose un aumento en los niveles de algunas inmunoglobulinas en el organismo (Salazar, B. Y Montoya, O., 2003).

#### **d. Producción de sustancias antimicrobianas**

De acuerdo a Nava, J. (2008), estos microorganismos metabolizan carbohidratos, sintetizan compuestos como: ácido láctico, fórmico, acético; peróxido de hidrógeno, aniones super óxido y radicales hidroxilo; dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído e isómeros D de aminoácidos. También pueden sintetizar algunas sustancias llamadas bacteriocinas como la reuterina, de naturaleza no proteica con bajo peso molecular que ejercen una acción antimicrobiana, al actuar sobre estructuras específicas de los diferentes microorganismos que ellos inhiben. Esto cobra mayor importancia cuando tales microorganismos son patógenos, como es el caso de la *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium difficile*.

#### **4. Nomenclatura para los microorganismos probióticos**

Según Guarner, F. *et al.* (2011), una cepa probiótica se identifica por su género, especie, y una designación alfa numérica. Las bacterias probióticas son bastante dependientes de la cepa, no dependientes de la especie. Una cepa es un tipo de especie de bacterias, de forma similar al siguiente ejemplo:

Grupo bacterial = bacteria del ácido láctico

Genero bacterial = *Lactobacillus*

Especie bacterial = *Lactobacillus acidophilus*

Cepa bacterial = = *L. acidophilus* LC1

#### **5. Principales microorganismos usados como probióticos**

A pesar de que no existan criterios ampliamente aceptados sobre determinadas características que deben reunir un microorganismo para ser considerado como probiótico, algunos de los más comúnmente usados para promover la salud y la

nutrición animal incluyen cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, y mohos de los géneros *Saccharomyces*, *Aspergillus* y *Torulopsis* (Tannock, G.,2001).

En el desarrollo de los alimentos probióticos propuestos para el consumo humano, las cepas de las bacterias ácido lácticas (BAL), tales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, han sido las usadas más comúnmente, debido al hecho de que son bacterias deseables de la microflora intestinal (Berg, L., 1998).

En el cuadro 1 se muestran las principales especies de BAL empleadas como probióticos.

Cuadro 1. ESPECIES BACTERIANAS EMPLEADAS COMO PROBIÓTICOS.

Género <i>Lactobacillus</i>	
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. johnsonii</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. salivarius</i>
Género <i>Bifidobacterium</i>	
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. infantis</i>
<i>B. animalis</i>	<i>B. lactis</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>
<i>B. breve</i>	
Género <i>Streptococcus</i>	
<i>S. lactis</i>	
<i>S. salvaris</i>	
<i>S. thermophilus</i>	
Otras BAL	
<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Leucocostoc mesentoides</i>	
Bacterias no ácido lácticas	
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>	
<i>Propionibacterium fredenreichii</i>	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	
Fuente: Pérez, D. (2003)	

## 6. Lactobacilos

Según Spreer, E. (1991), los lactobacilos son bacilos microaerófilos, grampositivos y catalasa negativos, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares. Los Lactobacilos homofermentativos dan lugar a ácido láctico como producto principal de fermentación. Este grupo está integrado por *Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus del brueckii*, los lactobacilos heterofermentativos producen además de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y otros productos volátiles; el *Lactobacillus fermenti* es heterofermentativo, que crece a temperaturas elevadas.

Los Lactobacilos, son microaerófilos o anaerobios, pero después de cultivos continuos, algunas cepas pueden desarrollarse en presencia de aire. Sus necesidades nutritivas son complejas, y la mayor parte de las cepas no puede cultivarse en los medios nutritivos ordinarios, a menos que se enriquezcan con glucosa y suero. Las necesidades individuales de aminoácidos varían de 2 a 15, además, en general se requiere piridoxina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido fólico y ácido nicotínico, variando las necesidades en cada caso. Estos requerimientos nutritivos variados tienen aplicación práctica en técnicas de dosificación microbiológica de vitaminas y de algunos aminoácidos, para los cuales son más sensibles que los métodos químicos disponibles (Spreer, E., 1991).

### a. **Especies de lactobacilos**

Según Bergey, D. (1992), el género *Lactobacillus* se divide en 44 especies, que se ubican en tres grupos diferentes según las vías de fermentación de hidratos de carbono:

**Homofermentantes obligados:** fermentan las hexosas casi completamente hasta ácido láctico. No fermentan pentosas o gluconato.

**Heterofermentantes facultativos:** fermentan las hexosas casi completamente a ácido láctico. En condiciones de glucosa limitante, fermentan las hexosas produciendo ácido láctico, acético, fórmico y etanol. Las pentosas son fermentadas hasta ácido láctico y acético.

**Heterofermentantes obligados:** fermentan las hexosas hasta ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético y etanol. Las pentosas son fermentadas hasta ácido láctico y acético.

Además, algunas de estas especies se subdividen en varias subespecies; tales son los casos de:

- *Lactobacillus delbrueckii* (con tres subespecies: *bulgaricus*, *lactis* y *delbrueckii*).
- *Lactobacillus salivarius* (con dos subespecies: *salivarius* y *salicinus*).
- *Lactobacillus casei* (con cuatro subespecies: *casei*, *pseudopantarum*, *rhamnosus* y *tolerans*).
- *Lactobacillus coryniformis* (con dos subespecies: *coryniformis* y *torquens*).

Bergey, D. (1992) refiere que existen también otras especies incluidas en el grupo de los *Lactobacillus*, pero que por las características demostradas en estudios de secuencia de oligonucleótidos, no revelan relaciones filogenéticas con este género y por tanto, se consideran en posiciones taxonómicas indeterminadas. Tales especies son: *Lactobacillus catenaforme*, *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rogosae* y *Lactobacillus xylosus*.

## **b. Características del cultivo y colonias**

Según Samaniego, L. y Sosa, M. (2002), las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas. Otras, como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas por excepción. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros



formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares (Bergey, D., 1992).

Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de Nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni sulfídrico ( $H_2S$ ). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas; presentan una reacción bencidina negativa (Samaniego, L. y Sosa, M., 2002).

La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Su crecimiento en medio líquido se presenta a través de éste, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Samaniego, L. y Sosa, M., 2002).

Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y aminas en el queso (Bergey, D., 1992).

### **c. Nutrición y condiciones de crecimiento**

Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de Carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de

cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de crecimiento especiales (Bergey, D., 1992).

Debido a que las bacterias ácido-lácticas (LAB) poseen requerimientos nutricionales y de crecimiento similares; su clasificación se ha tornado difícil por los métodos microbiológicos tradicionales. El uso de pruebas moleculares, basadas en secuencias de ADN ribosomal, para identificar las bacterias aisladas de su ambiente natural, fue informado por Tannock, G., (2001). Debido a la alta variabilidad de esta región entre especies, se emplea desde hace algunos años un método eficiente para la identificación y detección específica de bacterias ácido-lácticas probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR (polymerase chain reaction o reacción en cadena de la polimerasa) (Castellanos, M *et al.*, 1996).

#### **d. Condiciones ecológicas**

**pH:** Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 4,5 - 6,4 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan o al menos disminuyen considerablemente el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores, exceptuando el de otras bacterias lácticas y el de las levaduras (Bergey, D., 1992).

**Necesidades de Oxígeno:** La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular

el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey, D., 1992).

**Temperatura de crecimiento:** La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos se desarrollan por debajo de 15°C y hay cepas que lo hacen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos lactobacilos termófilos que crezcan por encima de 55°C (Bergey, D., 1992).

**Metabolismo:** En su metabolismo, los lactobacilos van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas (Samaniego, L. y Sosa, M., 2002).

Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación (Kandler, 1983), constituyendo al menos un 50% de los productos finales el ácido láctico, el cual usualmente no es fermentado (Bergey, D., 1992).

Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden Meyerhof, donde se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico por fermentación homoláctica y la vía del 6-fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, por fermentación heteroláctica. En condiciones aerobias, la mayoría de las cepas reoxidan el NADH<sub>2</sub> utilizando el O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones, de modo que el Acetil-CoA no es, o al menos no es completamente reducido a etanol. De esta manera, se forma ATP adicional por fosforilación a nivel de sustrato, así como

proporciones variables de ácido acético y etanol, en dependencia del suministro de Oxígeno (Bergey, D., 1992). En cuanto a los niveles enzimáticos, los lactobacilos heterofermentativos poseen fosfocetolasas, pero no FDP (difosfato fructosa) aldolasas, mientras que los homofermentativos poseen FDP aldolasas, pero no fosfocetolasas (Samaniego, L. y Sosa, M., 2002).

**Hábitat:** Los lactobacilos pueden encontrarse en productos lácteos, quesos, granos, productos cárnicos o de pescado, agua, aguas cloacales, cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas, col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas, aunque también forman parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y la vagina de muchos animales de temperatura estable, incluyendo al hombre. También pueden encontrarse en habitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus habitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos (Bergey, D., 1992).

#### **e. Plásmidos**

Bergey, D. (1992), menciona que en los lactobacilos se encuentran frecuentemente plásmidos relacionados con la resistencia a drogas (medicamentos) o con el metabolismo de la lactosa. Pero el único caso conocido de intercambio genético natural de plásmidos en *Lactobacillus* es el que ocurre por conjugación del plásmido que determina el metabolismo de la lactosa en *Lactobacillus casei*.

#### **f. Estructura antigénica**

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* se han asignado a siete grupos serológicos, basándose en los determinantes antigénicos específicos que poseen. Estos grupos se denominan: A, B, C, D, E, F y G. Como ejemplos están los casos de *L. helveticus*, perteneciente al Grupo A, cuyo antígeno específico es el GTA (ácido teicoico glicerol), localizado en pared celular y membrana y cuyo determinante antigénico es el  $\alpha$ -Gle (D-glucosil); así como *L. plantarum*, de antígeno RTA (ácido teicoico ribitol), localizado en la pared celular y con igual determinante antigénico que en el caso anterior (Bergey, D., 1992).

### **g. Fagos**

Se ha podido describir la morfología de numerosos fagos de doble cadena de ADN que resultan virulentos para muchas especies de *Lactobacillus* y se han llegado a conocer los parámetros químico-fisiológicos de siete de estos fagos. Los fagos virulentos poseen cabezas hexagonales y presentan generalmente largas colas contráctiles o no, por lo que todos pertenecen a los grupos A o B, con la excepción de un fago virulento para *Lactobacillus plantarum*. En sentido general, estos fagos son muy similares a los que atacan a otros grupos de bacterias. Por tales razones, la lisogenia es un proceso ampliamente distribuido dentro del género *Lactobacillus*. Y esto, a su vez, no ha favorecido los intentos de establecer esquemas de tipificación con fagos para este género bacteriano (Bergey, D., 1992).

### **h. Sensibilidad a antibióticos y drogas**

Los lactobacilos son sensibles ante la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram-positivas. Se ha podido estudiar la sensibilidad de los lactobacilos intestinales ante antibióticos empleados como aditivos alimenticios. La resistencia a la bilis es también una propiedad importante a tener en cuenta para la colonización del intestino por los lactobacilos y se ha estudiado principalmente en el caso de *Lactobacillus acidophilus* (Bergey, D., 1992).

### **i. Patogenicidad**

Bergey, D. (1992), afirma que aparte de las caries dentales, la patogenicidad de los lactobacilos es rara; aunque últimamente se han informado algunos procesos infecciosos en humanos donde estos microorganismos se han encontrado involucrados. Tales son los casos de abscesos, septicemias sistémicas y endocarditis bacterianas, provocados por *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *Lactobacillus salivarius*. Sin embargo, las bases bioquímicas de tal patogenicidad aún se desconocen.

## 7. *Lactobacillus casei*

### a. Características Generales

Luján, M. (2007), afirma que los miembros del grupo *casei* son bacterias Gram positivas, cuyas dimensiones son  $0,7 - 1,1 \mu\text{m} \times 2,0 - 4,0 \mu\text{m}$  y se presentan aislados, de a pares o en cadenas. En su pared celular, el peptidoglicano es del tipo Lys-D-Asp y no se encuentran ácidos teicoicos unidos a ella. Son esenciales para su crecimiento la riboflavina, ácido fólico, calcio, pantotenato y niacina. Todas las especies del grupo son heterofermentantes facultativos. Pueden fermentar una mayor cantidad de carbohidratos en comparación con la mayoría de *lactobacillus* encontrados en las leches fermentadas.

Esta bacteria, productora de ácido láctico, se emplea en la industria láctea en la elaboración de alimentos probióticos. Se ha comprobado que esta especie particular de lactobacilo es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura, siendo además un complemento al crecimiento de *L. acidophilus*, un productor de la enzima amilasa (una enzima digestiva de carbohidratos en la saliva y en el jugo pancreático de mamíferos). Ayuda a la digestión y la tolerancia a la leche. Por esta razón se emplea en la elaboración de diversos alimentos funcionales (Luján, M., 2007).

### b. Taxonomía

Los lactobacilos del grupo *casei* exhiben una heterogeneidad fenotípica y genotípica considerable y se hicieron varios intentos para clasificarlos. En el pasado, todos los miembros fueron clasificados como *L. casei* con 5 subespecies (*alactosus*, *casei*, *pseudopantarum*, *ramnosus* y *tolerans*), (Luján, M., 2007), como se observa en el (cuadro 2).

La taxonomía vigente considera al grupo *casei* conformado por tres especies:

- *L. casei* (cepa tipo ATCC 393).
- *L. paracasei* subsp. *paracasei* (cepa tipo ATCC 334) y *L. paracasei* subsp. *tolerans* (cepa tipo ATCC 25599).

- *Lb. rhamnosus* (cepa tipo ATCC 7469) (Luján, M., 2007).

Cuadro 2. TAXONOMÍA DE *Lactobacillus casei*.

Taxonomía anterior	Taxonomía reciente	Propiedades metabólicas	
		Temperatura de crecimiento	Fermentación de azúcares
<i>L. casei</i> subsp.			
<i>Casei</i>	<i>L. casei</i>	10-40 °C	Ribosa, Sacarosa
<i>L. casei</i> subsp.	<i>L. paracasei</i> subsp.		Metaboliza gran
<i>paracasei</i>	<i>paracasei</i>	10-40 °C 10-37°C resistente	variedad de azúcares
<i>L. casei</i> subsp.	<i>L. paracasei</i> subsp.	hasta 72°C; 40	Metaboliza gran
<i>Tolerans</i>	<i>Tolerans</i>	minutos	variedad de azúcares
<i>L. casei</i> subsp.			
<i>Ramnosus</i>	<i>L. ramnosus</i>	15-45 °C	Ramnosa

Fuente: DANONE WORLD NEWSLETTER. (1995).

### c. Requerimientos nutricionales y micronutrientes para *L. casei*

Según Bergey, D. (1992), los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos para los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos como fuentes de Carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Por eso, estos compuestos se incluyen en el medio MRS. Existen especies que se adaptan a sustratos muy particulares y necesitan factores de crecimiento especiales (Bergey, D., 1992).

**Micronutrientes:** Como su nombre lo dice los micronutrientes se requieren en pequeñas cantidades, sin embargo son de suma importancia en el crecimiento celular, además que, funcionan como cofactores y sirven de estructura para varias enzimas, por ejemplo, el manganeso, es un cofactor de crecimiento esencial para el *Lactobacillus casei* debido a su función como constituyente de la enzima lactosa deshidrogenasa por consiguiente debe ser añadido al medio de cultivo en forma de  $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ . Esto es necesario junto con la suplementación de extracto de levadura para mejorar la productividad de ácido láctico y el consumo de lactosa.) (Mardigan, M., et al., 2004).

#### **d. Transporte y metabolismo de la lactosa en *L. casei***

El disacárido cuyo metabolismo ha sido más extensamente estudiado en bacterias lácticas es la lactosa. Esto es debido a la importancia económica de las fermentaciones lácteas, que originan productos como el queso y el yogur, y dependen del metabolismo de este azúcar. La lactosa es fermentada dando como producto mayoritario ácido láctico, pero también se producen otros compuestos de interés tecnológico, como exopolisacáridos que contribuyen a la textura y diacetilo o acetaldehído que son importantes para el aroma a mantequilla y yogur, respectivamente (Esteban, C., 2004). La lactosa puede ser transportada y fosforilada por una PTS (fosfotransferasa), como ocurre en cepas de *L. lactis* y *L. casei*. Posteriormente la lactosa-P es hidrolizada por una fosfo-b-D-galactosidasa en galactosa-6-P, que se metaboliza por la ruta de la tagatosa-6-P, y glucosa, que es canalizada a la glucólisis al ser fosforilada por la glucokinasa. También se puede transportar la lactosa por una permeasa y ser hidrolizada por una b-galactosidasa en galactosa y glucosa. En este caso la galactosa se metaboliza por la ruta de Leloir (gráfico 1). Algunas bacterias lácticas, como *S. thermophilus*, *L. delbrückii* y *L. acidophilus*, después de hidrolizar la lactosa, solo metabolizan la glucosa, la galactosa es expulsada al medio. La existencia de un antiportador galactosa/lactosa permite que la salida de galactosa sirva de fuerza impulsora para el transporte de lactosa (Poolman, B., 1993).



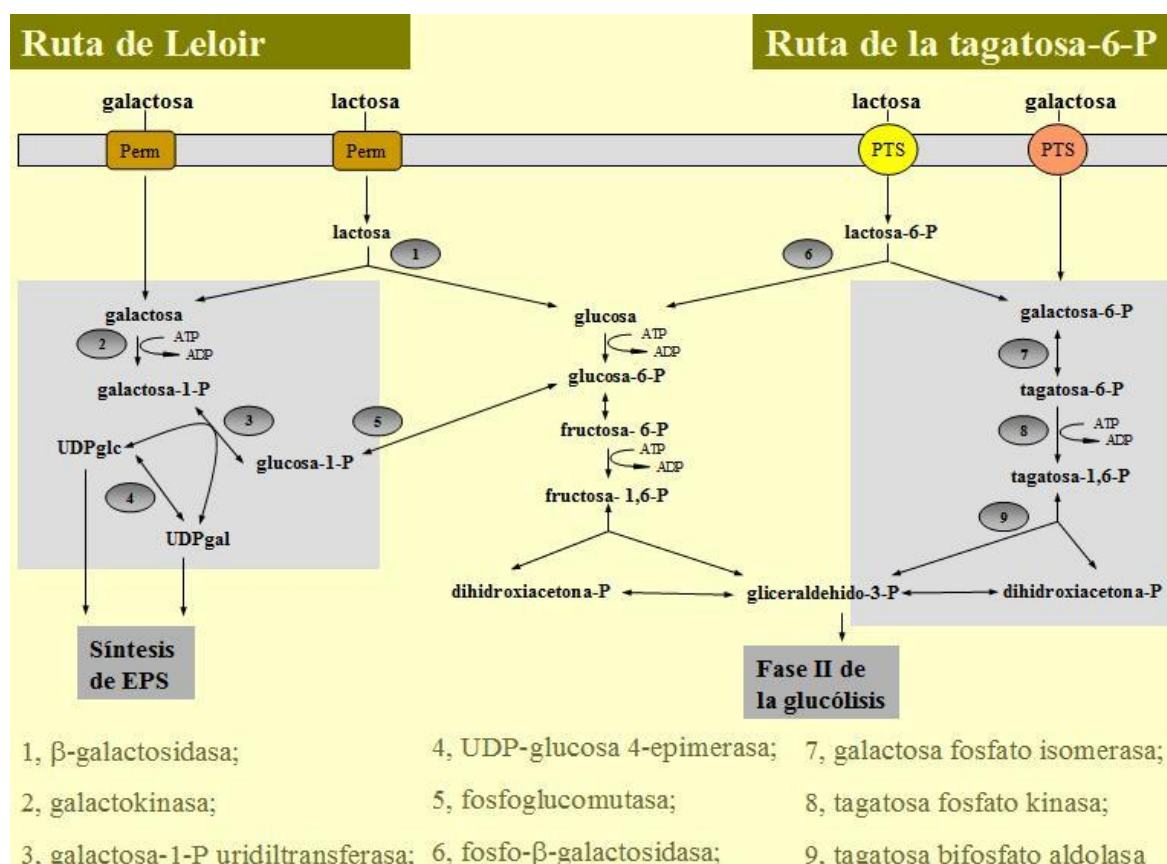


Gráfico 1. Metabolismo de la lactosa. Rutas de Leloir (izquierda) y de la Tagatosa- 6P (derecha).

Fuente: (Esteban, C., 2004)

#### e. Factores que afectan el crecimiento de *L. casei*

La velocidad específica de crecimiento bacteriano en la producción de biomasa bacteriana, depende de varios factores que pueden afectar el crecimiento del *Lactobacillus casei* en el medio de fermentación, algunos de estos son: la fuente de carbono y nitrógeno, el tipo de fermentación, el pH, la temperatura, la formación de subproductos, entre otros (Mardigan, M., *et al.*, 2004).

#### f. Fuente, aislamiento y conservación de *L. casei*

El *Lactobacillus casei* actualmente dispone de muchos medios de cultivos para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas aunque algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos; la capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas y bioproductos (Villanueva, G., 2007). Para análisis, cultivo, conservación y aislamiento microbiológicos del microorganismo generalmente se utilizan los siguientes procedimientos tales como:

- Recuento en agar MRS.
- Recuento en agar M17.
- Tinción de Gram.
- Prueba de la Catalasa.
- Prueba de la Oxidasa.
- Liofilización.
- Conservación en nitrógeno líquido.
- Aislamiento del *Lactobacillus casei* proveniente de leches fermentadas.
- Encapsulamiento.

Para la identificación se cuenta con las siguientes alternativas.

**Catalasa:** se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno (Villanueva, G., 2007).

**Oxidasa:** prueba que sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana (Villanueva, G., 2007).

**Tinción de Gram:** coloración que permite la clasificación de las bacterias en Gram positiva y Gram negativa según la composición de su pared celular (Villanueva, G., 2007).

Para la conservación de las bacterias lácticas existen una gran variedad de métodos de mantenimiento y conservación cuya utilización va a depender en parte del tiempo previsto; entre estas podemos encontrar:

**Liofilización:** consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismo y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por estado intermedio líquido (Álvarez, D., 2004).

**Conservación en nitrógeno líquido (-196°C):** la actividad metabólica de los microorganismos puede ser reducida considerablemente almacenándolos en temperaturas muy bajas lo cual puede lograr utilizando nitrógeno líquido. Este es el método más adecuado para la mayoría de las células (Álvarez, D., 2004).

**Aislamiento del *L. casei* proveniente de leches fermentadas:** La leche fermentada se deja fermentar alrededor de 25 días antes de iniciar el aislamiento. Estas células se aíslan en agar selectivo MRS (Man Rogosa Y sharpe) y se incuban en condiciones anaeróbicas durante 48 horas a 37°C. Las colonias aisladas en el medio MRS se caracterizan morfológicamente por medio de la coloración gram y pruebas bioquímicas convencionales como reducción de azúcares y catalasa, las colonias que no se ajustan a estos parámetros son descartadas. Luego de esta etapa se escoge algunas de las técnicas de conservación de microorganismos más apropiada (Álvarez, D., 2004).

## **B. BENEFICIOS Y APLICACIONES DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS**

### **1. Beneficios de los probióticos en la salud humana**

El auge de los alimentos enriquecidos con estos microorganismos se debe a una gran variedad de beneficios que le proporcionan al consumidor, los cuales se han evidenciado a través de una serie de investigaciones. Entre los más destacados se encuentran los siguientes:

#### **a. Facilitan la digestibilidad de la lactosa**

Los microorganismos probióticos, al estar en el intestino, liberan la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que actúa sobre la lactosa hidrolizándola hasta glucosa y galactosa, de esta manera evita que personas intolerantes al carbohidrato presenten síntomas como flatulencia, dolor abdominal y diarrea, al consumir leche (Bengmark, S., 1996).

#### **b. Protegen contra enfermedades gastrointestinales.**

Solis, B., et al. (2002), afirman que la patología intestinal puede darse por un consumo de antibióticos que inhiben o destruyen la microbiota natural y/o la

colonización por microorganismos enteropatógenos como la *Klebsiella oxytoca* y *Clostridium difficile*, que causan lesiones en el colon. Con el consumo de alimentos con probióticos específicamente *Lactobacillus rhamnosus* GG, y *Lactobacillus reuteri*, se recupera el balance de la microbiota intestinal nativa y se evita la adhesión de algunos virus, bacterias patógenas o parásitos que pueden ser agentes causales de la gastroenteritis, la diarrea del viajero y la inflamación intestinal, el síndrome de colon irritable que en última instancia pueden ser la causa del cáncer de colon; los probióticos han mostrado un efecto favorecedor en la prevención de mutaciones, al desactivar carcinógenos genotóxicos, en un sistema *in vitro* (Marteau, P., *et al.*, 2009).

**c. Protegen contra infecciones del tracto urogenital.**

La vaginitis inducida por bacterias y/o levaduras, es una infección estrechamente relacionada con la exposición a antibióticos y espermicidas y también depende del estado hormonal de la mujer. Con el consumo de mezclas probióticas, se han obtenido buenos resultados en la restauración de la microbiota natural urogenital benéfica, que desplaza a los causantes de la inflamación en vagina y uretra (Reid, G., 2001).

**d. Promueven la barrera de defensa endógena del intestino.**

Aunque, el tracto gastrointestinal normalmente es una barrera natural contra antígenos de origen microbiano y alimentario, la presencia de los probióticos adheridos a la mucosa intestinal, estimula o potencia el sistema inmune, lo que favorece la inmuno modulación que se manifiesta en un aumento en los niveles de inmunoglobulinas, y una activación de las células mononucleares y de los linfocitos para proteger al huésped de las infecciones. Sin embargo los mecanismos específicos aún no están claros (Isolauri, E., *et al.*, 2007).

**e. Protegen contra infecciones respiratorias**

Los probióticos aumentan la actividad fagocítica de macrófagos alveolares que actúan sobre microorganismos patógenos presentes en las vías respiratorias. Se hizo un estudio a 571 niños sanos con edades entre uno y

seis años divididos en dos grupos: a uno de ellos se les incluyó en su dieta leche suplementada con *Lactobacillus* GG, y a los otros niños leche no suplementada, observándose una disminución del 19% de enfermedades respiratorias tales como otitis media, sinusitis, bronquitis y neumonías en aquellos niños alimentados con *Lactobacillus* GG (Hatakka, K., *et al.*, 2006). Lo anterior fue corroborado por Río y colaboradores cuando suministraron *Lactobacillus acidophillus* y *Lactobacillus casei* en niños para observar el efecto sobre patologías de vías respiratorias habituales en esta etapa de la vida, quienes concluyeron que el suministro de lactobacilos previno las neumonías y disminuyó la frecuencia de bronquitis en niños normales y desnutridos. Además, observaron que la desnutrición predispone hacia una mayor severidad en las patologías y limita la efectividad de estos microorganismos, posiblemente por disminuir la capacidad del organismo ante la respuesta inmune (Río, M., *et al.*, 2007).

#### **f. Previenen el eczema**

El consumo de probióticos ayuda en la inflamación alérgica o eczema atópico, porque mejora significativamente las condiciones de la piel, la concentración de citoquinas circulantes y moléculas de adhesión a las superficies de las células (Isoulari, E., *et al.*, 2005).

#### **g. Previenen la infección en heridas quirúrgicas**

Los probióticos del tipo *Lactobacillus fermentum*, impiden la unión de patógenos, a las superficies celulares en heridas, mediante la secreción de proteínas. Estudios realizados en la aplicación de probióticos sobre heridas en piel de ratas, y se ha encontrado una disminución del 90% en la colonización por parte del *Staphylococcus aureus*, uno de los patógenos más temidos y de mayor incidencia en infecciones hospitalarias (Strauss, E., 2000).

## **2. Desarrollo de alimentos funcionales**

Parzanese, M. (2011), menciona que en la actualidad dado el incremento significativo de la demanda de productos saludables por un amplio sector de la

sociedad, el mercado de alimentos probióticos y prebióticos se encuentra en continua expansión. Un ejemplo de tal crecimiento lo da el sector de derivados lácteos adicionados con probióticos, como estos productos son los más adecuados para utilizar como matriz de microorganismos probióticos, la oferta de leches fermentadas, yogures, quesos, etc. con efectos beneficiosos para la salud aumenta día a día.

Cabe mencionar que en investigaciones recientes se encontró que los quesos presentan numerosas ventajas para ser utilizados como vehículos de probióticos sobre los demás productos lácteos, ya que poseen pH y capacidad buffer mayor, consistencia más sólida (menor oxígeno ocluido) y mayor contenido de grasa Nava, J. (2008). Todas estas características otorgan mayor protección a los probióticos durante el tiempo de almacenamiento de producto terminado y durante su paso por el tracto gastrointestinal, lo cual asegura mayor efectividad del producto respecto a sus efectos benéficos para la salud (Parzanese, M., 2011),

#### **a. Probióticos en alimentos no lácteos**

El uso más frecuente de los probióticos es en productos lácteos. Su aplicación en otro tipo de alimentos representa un desafío y exige el estudio de la viabilidad del probiótico en la matriz del alimento. En casos en que existan factores desestabilizantes (por ej., en alimentos que se almacenan a temperatura ambiente), la tecnología de encapsulamiento de microorganismos presenta una opción para asegurar la viabilidad y estabilidad del probiótico (Luján, M., 2007).

#### **b. Alimentos con múltiples cepas probióticas**

Alimentos funcionales dirigidos a mantener o mejorar el bienestar de los consumidores, que contienen más de una cepa probiótica, de modo que logran más de un efecto benéfico en un único producto. Se diseñan de un modo racional, considerando que los mecanismos de acción de los probióticos pueden ser diferentes (Luján, M., 2007).

**c. Alimentos con probióticos dirigidos a consumidores específicos:**

Los conocimientos adquiridos en relación con la microbiota intestinal, nutrición, inmunidad, mecanismos de acción y enfermedades específicas, cuidadosamente combinados con información genética, permitirán el desarrollo de una segunda generación de probióticos: cepas que actúen en un sitio determinado y para individuos que padecen enfermedades específicas o tienen necesidades particulares. Estos productos requieren de condiciones de producción más controladas (Luján, M., 2007).

**d. Alimentos con cepas probióticas modificadas**

Las modificaciones pueden lograrse mediante inducción tradicional o genéticamente. Resultados preliminares obtenidos recientemente indicaron que, debido a la inactivación de un gen, una cepa de *Lb. plantarum* produjo un ácido lipoteicoico modificado que mejoró notablemente la capacidad anti-inflamatoria en ratones (Luján, M., 2007).

**3. Biopreservación**

Samaniego, L. y Sosa, M. (2002), declaran que las bacteriocinas como la nicina producidas por bacterias acidolácticas juegan el papel de “antibióticos” en la preservación de alimentos. En la actualidad a este proceso se le ha llamado biopreservación, para diferenciarlo de la preservación química de alimentos.

Las bacteriocinas son los preservativos de alimentos naturales más prometedores debido a su actividad inhibitoria contra una variedad de organismos que compiten en los alimentos, estas sustancias se han usado ampliamente en fermentaciones de vegetales, carnes y leche (Samaniego, L. y Sosa, M., 2002).

Entre las especies de *Lactobacillus* que desempeñan un papel interesante en la biopreservación se encuentra *L. plantarum*, bacteria que contiene plásmidos propensos a portar importantes enzimas de la fermentación (Samaniego, L. y Sosa, M., 2002).

## **C. SUSTRATOS**

### **1. Definición**

Pérez, J. y Gardey, A. (2010), mencionan que en ecología, el sustrato es la parte del biotopo (área de condiciones ambientales uniformes) donde ciertos seres vivos desarrollan sus funciones vitales y se relacionan entre sí. En la biología, el concepto de sustrato está vinculado a la superficie en la que vive un animal o una planta, que está formada tanto por factores bióticos como abióticos.

El sustrato también puede ser una especie química que se considera como objeto de la acción de uno o más reactivos; por ejemplo, un compuesto transformado por la acción de un catalizador (Pérez, J. y Gardey, A., 2010).

La bioquímica sostiene que un sustrato es una molécula sobre la cual actúa una enzima. Dicho de otra forma, las enzimas se encargan de catalizar las reacciones químicas que involucran a un sustrato. La unión entre la enzima y el sustrato forma un complejo (Pérez, J. y Gardey, A., 2010).

### **2. Sustratos en Microbiología Industrial**

Las características de los procesos microbianos a escala industrial presentan grandes diferencias con los procesos a escala de laboratorio. Esto es particularmente crítico en lo referente a sustratos: en laboratorio, están perfectamente definidos en cuanto a composición, pureza, etc.; mientras que a escala industrial esto no es posible por no ser económicamente viable, por lo que se utilizan generalmente residuos de otras industrias (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

Estos residuos han de cumplir los siguientes requisitos para poder ser usados como sustrato:

- Contener una fuente de carbono y nitrógeno suficientemente rica. Han de presentarse en formas asequibles por las células.



- Cierta contenido en oligoelementos y sales minerales, básicos para que los microorganismos efectúen sus funciones.
- Tamponadores de pH. Debido a la actividad microbiana, el pH del medio puede sufrir grandes variaciones, lo que puede llegar a inhibir el crecimiento microbiano. Para minimizar estos efectos, se añaden tampones.
- Su composición ha de ser lo suficientemente equilibrada: sin exceso ni limitación de ningún nutriente necesario. Si no fuese así, el metabolismo del microorganismo puede desequilibrarse hacia procesos que no son los habituales, lo que puede interesarnos o no, en función de si los productos producidos son los que buscamos.

Los sustratos industriales presentan el gran inconveniente de que, por lo general, su composición es desconocida y variable. Los sustratos se escogen, además de su composición, por cercanía a la zona, ya que así se disminuyen los costes de transporte (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

### **3. Sustratos usados como fuentes de carbono**

Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C. (2007), indican los siguientes elementos como las fuentes de carbono mayormente empleadas:

#### **a. Extracto de malta**

Proviene como residuo del malteado de la cebada en la fabricación de cerveza. Presenta fuentes de carbono fácilmente asimilables (azúcares sencillos), y variadas y ricas fuentes de nitrógeno (aminoácidos, proteínas y pépticos). Dada su composición, se pueden producir condensaciones de Maillard durante el proceso de esterilizado. Estas reacciones se producen entre grupos amino y carboxilo de proteínas y azúcares, dando compuestos de degradación muy complejos. La consecuencia es la disminución de los nutrientes asimilables por los microorganismos.

**b. Almidón y dextrinas**

Son polímeros de azúcares que requieren la presencia de amilasas específicas para su degradación. Es necesario degradarlos cuando los microorganismos carecen de las amilasas: por adición de amilasas al medio de cultivo, por hidrólisis química u obtención de mutantes capaces de producir amilasas.

**c. Desechos de madera e industrias papeleras**

Muchos de ellos son directamente aprovechables por los microorganismos, pero otros, como la celulosa, requieren tratamiento especial. Al igual que el almidón, la celulosa requiere de un sistema enzimático especial para su degradación. Si el microorganismo no lo posee, es necesario proporcionarlo en el medio, efectuar una hidrólisis química o usar cepas mutadas capaces de degradarla.

**d. Aceites vegetales**

No son válidos como única fuente de carbono, aunque sí como complemento de medios con bajo contenido en carbono.

**e. Alcoholes de bajo número de carbonos**

**Metanol:** son pocos los microorganismos capaces de utilizarlo. Se usa en producción de proteína unicelular y de ciertas vitaminas.

**Etanol:** se usa principalmente para la obtención de ácido acético, aunque se están adaptando procesos para sintetizar diferentes sustancias usándolo como sustrato.

**f. Alcanos de 12 a 18 carbonos**

Son subproductos del petróleo, por lo que su mayor inconveniente es que su precio está determinado por el precio del petróleo. Sólo son válidos para unos pocos microorganismos.

#### **4. Sustratos usados como fuentes de nitrógeno**

Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C. (2007), sostienen que en ocasiones, lo que se hace es enriquecer los sustratos con especies químicas ricas en nitrógeno, como urea o nitrato amónico, así tenemos los siguientes sustratos usados habitualmente como fuentes de nitrógeno:

##### **a. Extracto de levadura**

Se obtienen de levaduras, por plasmólisis (debido a la adición de gran cantidad de NaCl) o termólisis. Es el extracto más usado para el aporte de nitrógeno. Contienen una gran variedad en fuentes de nitrógeno (aminoácidos, péptidos, etc.) y carbohidratos.

##### **b. Peptonas**

Estados intermedios de degradación de proteínas de diversos orígenes. Son más homogéneas en su composición que el extracto de levadura. Son bastante caras y su composición varía según el origen, pero dentro de una misma clase, hay pocas diferencias.

##### **c. Harina de soja**

Se usan mucho como sustratos para la producción de antibióticos, ya que son muy indicadas para los hongos y actinomicetos que efectúan dichos procesos.

##### **d. Líquidos de maceración del maíz**

Procede de industrias alimentarias. Contiene fuentes muy ricas de nitrógeno fácilmente asimilables.

#### **5. Melaza**

La miel o también llamada melaza, es un líquido denso y viscoso de color oscuro, producto final de la fabricación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar.

Presenta formas asimilables de carbono y nitrógeno, así como sales y oligoelementos suficientes (Leeson, S. y Summers, J., 2000). Entre los principales azúcares fermentables están la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa; las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (cuadro 3).

Cuadro 3. COMPOSICIÓN DE LA MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63% p/p
	Azúcares reductores	3-5% p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8% p/p
	Agua	16%
	Grasa	0,40%
	Cenizas	9%
	Calcio	0,74 %
	Magnesio	0,35%
Contenido de minerales	Fósforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de Aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
	Treonina	0,06%
	Valina	0,02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600pp
	Niacina	48,86 ppm
	Ácido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

Fuente: Vaca, R. (2011).

## **6. Lactosuero**

El suero es la parte líquida que queda después de separar la cuajada al elaborar el queso. El suero que resulta de la coagulación de la leche en la elaboración de queso, contiene valiosas materias como proteínas, lactosa y sales minerales (Madrid, A., 1996).

Las características del tipo de lactosuero dependen de la coagulación a la que fue sometida la leche, pudiéndose diferenciar dos tipos fundamentales: lactosuero dulce o enzimático y lactosuero ácido.

### **a. Lactosuero dulce**

Se debe destacar que en el lactosuero dulce o enzimático la casi ausencia de ácido láctico debido a que no se desarrollan los microorganismos que lo producen, por lo que el pH es muy cercano al de la leche y no hay variación de la composición mineral. El suero dulce es el más empleado por la industria y tiene una composición química más estable (Córdoba, R., 2013).

### **b. Lactosuero ácido**

Este se produce por coagulación ácida, se adiciona un ácido mineral u orgánico o por la acción de los microorganismos propios de la leche. Cuando el valor de pH llega a 4.6, que corresponde al punto isoelectrico de las caseínas, están floculan formando un precipitado más o menos granuloso, pero si la acidificación se da lentamente, se formará un coágulo liso y homogéneo que ocupara el volumen inicial de la leche (Córdoba, R., 2013).

En cuadro 4 se pueden observar las diferencias entre el lactosuero enzimático y el lactosuero ácido.

Cuadro 4. COMPOSICIÓN DE LOS LACTOSUEROS DULCE Y ÁCIDO.

COMPONENTE	LACTOSUERO DULCE	LACTOSUERO ÁCIDO
	(%)	(%)
Ph	6.5	4,6
Humedad	93 – 94	94 – 95
Proteínas	0,8 – 1.0	0,8 – 1,0
Grasa	0,2 – 0.7	0,04
Lactosa	4,5 – 5,0	3,8 – 4,2
Sales Minerales	0,05	0,4
Ácido Láctico	Trazas	0,8
Ácido Cítrico	0,15	0,1

Fuente: Chamorro, M y Losada, M. (2002).

#### D. MEDIOS DE CULTIVO

Según Clark, D., *et al.* (2007), el cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio.

Un microorganismo necesita para crecer nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO<sub>2</sub> atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico.

La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente, C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N lo que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno (32%), nitrógeno (14%), fósforo (3%), azufre (en torno al 1%) y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn. La elaboración de medios de cultivo requiere proporcionar los elementos antes citados en una forma asimilable.

Así, por ejemplo, el C debe estar en forma de carbono orgánico para los heterótrofos y como  $\text{CO}_2$  para los autótrofos, el N en forma de  $\text{NH}_4$ , de  $\text{NO}_3^-$  o de  $\text{NO}_2^-$  o en forma de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; el P debe estar en forma de  $\text{PO}_4^{3-}$ , el S procede de aminoácidos sulfurados o de  $\text{SO}_4^{2-}$ , etc. Además, en ciertos casos, es necesario añadir a los medios de cultivo algunos aminoácidos o vitaminas que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar.

### 1. Tipos de medio de cultivo

Clark, D., *et al.* (2007), afirma que medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.). Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros (por ejemplo, el medio SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina) para clostridios, diferenciales cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos (por ejemplo medios con hemáties para identificar colonias de microorganismos hemolíticos), selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey para identificar *Escherichia coli*), y medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño (Clark, D., *et al.*, 2007).

### 2. Biorreactores

Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va

aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

### **3. Modos de operación de un biorreactor:**

#### **a. Discontinuo o reactor en Batch**

Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C. (2007), sostienen que se trata de sistemas cerrados en los que no se varían externamente las condiciones iniciales (lo que supone que la composición del medio va variando continuamente en el tiempo conforme se desarrolla el cultivo). En los procesos discontinuos o tipo batch, el aporte de nutrientes es único, el tiempo de fermentación es limitado y el producto es recuperado íntegramente al final de la fermentación por vaciado de la cuba del fermentador. Este método es actualmente el más utilizado para los productos que necesitan condiciones de esterilidad muy estrictas.

#### **b. Semicontinuo**

El sustrato se aporta de forma secuencial (no todo el sustrato es añadido al principio). Se debe a que, en ciertos procesos, la concentración de nutrientes ejerce efectos inhibitorios sobre el proceso o el crecimiento del microorganismo; lo que se evita haciendo un aporte secuencial de los nutrientes (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

#### **c. Continuo.**

Se retiran productos y sustrato agotado al mismo tiempo que se aporta la misma cantidad de sustrato fresco. Para ello, cuentan con diversos sistemas que permiten conocer cuándo se obtiene el nivel de producción adecuado, para poder empezar a retirar caldo fermentativo e introducir sustrato fresco. Las células que quedan actúan como inóculos. Aunque teóricamente es el régimen de trabajo



ideal, presentan numerosos inconvenientes técnicos. Estos inconvenientes son, entre otros, que sólo podemos conocer el nivel de crecimiento del microorganismo, y ciertos productos sólo se sintetizan en la fase estacionaria, por lo que no sabemos cuándo se habrá alcanzado el nivel de producción deseado. Además, las condiciones óptimas para el crecimiento y para la producción serán diferentes, lo que complica aún más el proceso (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

#### **4. Crecimiento microbiano en medio líquido**

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres (Cuellas, A., 2007). En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases (gráfico 2), en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

##### **a. Fase Lag o de adaptación**

Durante esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

##### **b. Fase exponencial o logarítmica**

En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

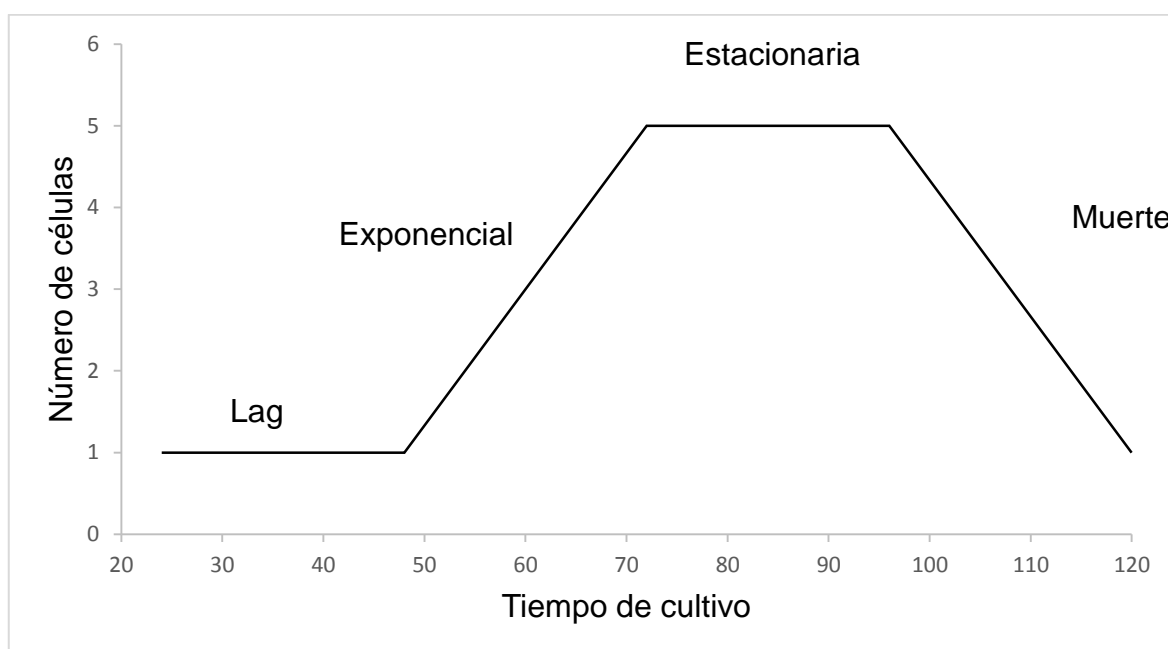


Gráfico 2: Fases de crecimiento bacteriano en un cultivo discontinuo o Batch.

Fuente: Cuellas, A. (2007).

### c. Fase estacionaria

En esta fase no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

### d. Fase de muerte

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. Como consecuencia de esta pérdida, no se produce aumento en el número de microorganismos y, por tanto, no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad

metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas (Erlota, R., Yantorno, O., Y Minogne C., 2007).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO**

El presente trabajo experimental se llevó a cabo en la Provincia de Chimborazo, Cantón Riobamba en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal, ubicada en el kilómetro 1 1/2 Panamericana Sur, a una altitud de 2.740 m. s. n. m. con una latitud de 01° 38' s y una longitud de 78° 40' W.

La investigación tuvo una duración de 60 días distribuidos en dos ensayos.

#### **B. UNIDADES EXPERIMENTALES**

Para la presente investigación se utilizó 12 litros de melaza y 12 litros de suero de leche, los mismos que fueron distribuidos en dos condiciones (agitación y estático) con tres repeticiones y dos ensayos motivos de estudio.

#### **C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES**

Para la realización de la presente Investigación se utilizaron los materiales, equipos e instalaciones descritos a continuación:

##### **1. Instalaciones**

- Laboratorio.
- Oficina.

##### **2. Equipos y materiales de Laboratorio.**

- Agitador de matraces.
- Refrigerador.
- Estufa.

- Cámara de flujo laminar.
- Hemocitómetro.
- Microscopio.
- Micropipeta.
- Autoclave.
- Reverbero.
- Lámparas de alcohol.
- Agitador magnético.
- Balanza normal.
- Balanza analítica.
- Cajas Petri.
- Vasos de precipitación.
- Matraces.
- Pipetas.
- Tubos de ensayo.
- Botellas termoresistentes.
- Tapones para matraces.
- Papel absorbente.
- Papel aluminio.
- Vórtrex.
- Caja de cartón.
- Bombilla de luz.
- Termómetro.
- Potenciómetro.
- Alcohol antiséptico.
- Alcohol industrial.

### 3. **Materia prima e insumos**

- Agar MRS.
- Cultivo comercial liofilizado de *Lactobacillus casei*.
- Lactosuero dulce.

- Melaza de caña de azúcar.
- Fosfato de amonio.

#### D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los tratamientos utilizados en esta investigación corresponden a los sustratos (melaza de caña y lacto suero), considerados como Factor A y las condiciones (agitación y estático) los cuales se considera como factor B, con dos ensayos y tres repeticiones por ensayo: cabe mencionar que para el análisis estadístico se unen las repeticiones de los dos ensayos, teniendo así un total de 6 repeticiones por tratamiento (cuadro 5).

Los resultados fueron organizados mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo combinatorio, y 6 repeticiones por tratamiento, teniendo un total de 24 unidades experimentales.

Cuadro 5. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Factor A Sustratos	Factor B Condiciones	Código	Repeticiones	T.U.E.(Lt)	Lts/trat,
A1	B1	A1B1	6	1	6
A1	B2	A1B2	6	1	6
A2	B1	A2B1	6	1	6
A2	B2	A2B2	6	1	6
Total			24		24

#### E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

##### 1. Variables Microbiológicas

- Velocidad de crecimiento específica  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) de *Lactobacillus casei* en cada tratamiento.

- Viabilidad de crecimiento de *L. casei* en cada tratamiento (logaritmo de células viables /ml).
- Rendimiento Biomasa-sustrato Y (X/S).

## 2. Variables económicas

- Indicador beneficio-costo (B/C).

## F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

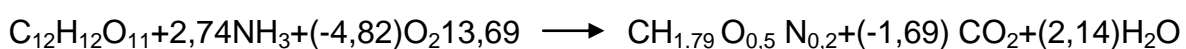
Los resultados experimentales fueron procesados en el software estadístico Infostat versión 2016 libre. La información obtenida se analizó de la siguiente manera:

Separación de medias según la Prueba no paramétrica de Friedman ( $P < 0,05$ ). Se utilizó este método después de comprobar que los datos obtenidos no presentaron una normalidad (Anexo 7), requerida para aplicar el análisis de varianza. Sin embargo, la prueba de Friedman es la alternativa para analizar este tipo de datos, con el que se obtuvo las medias respectivas.

## G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. Formulación de los sustratos

- Se realiza en base a los requerimientos nutricionales, balanceando fundamentalmente las cantidades de carbono y nitrógeno que necesita el *L. casei* para su crecimiento.
- Se considera la siguiente reacción biológica balanceada, que corresponde al crecimiento de *L. casei* (habitualmente usado para la fermentación láctica), usando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno:



- Los coeficientes estequiométricos calculados permiten establecer los requerimientos para la formulación de los medios de cultivo a base de melaza y lactosuero para la creación de biomasa (cuadro 6).

Cuadro 6. FORMULACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MELAZA Y LACTOSUERO,

COMPONENTE	FÓRMULA PARA LA MELAZA	FÓRMULA PARA EL LACTOSUERO
Melaza (ml)	20 (8%)	-
Lactosuero (ml)	-	248 (99,2%)
Fosfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) (gr)	2,5 (1%)	2 (0,8%)
Agua destilada (ml)	227,5 (91%)	-
TOTAL (ml)	250 (100%)	250 (100%)

- A cada uno de los medios de cultivo formulados, se añade 0,05% de inóculo (125 mg).

## 2. Preparación de los biorreactores a escala de laboratorio

- Pesar los componentes de cada formulación para establecer los medios de cultivo en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad, con sellado hermético.
- Esterilización de los medios en una autoclave con una temperatura de 120 ° C por una hora.
- Inoculación del medio con la cepa liofilizada y con agitación por 5 minutos.
- Distribuirlos biorreactores en condiciones de reposo (estufa) y agitación (agitador de matraces) a una temperatura de 36-37°C durante todo en experimento.
- Medir diariamente el pH de los medios de cultivo.



### 3. Siembra en cajas Petri

- Preparar agar MRS según las indicaciones del envase (70 g de medio en 1000 ml de agua purificada), esterilizar dentro de frascos termoresistentes y finalmente verter 10 ml de agar en cada caja Petri.
- Tomar muestras de 5 ml de cada medio de cultivo cada 24 horas después de la inoculación y realizar diluciones sucesivas desde  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ .
- Tomar 1 ml de cada dilución y sembrar en las cajas Petri con el método de vertido en placa, codificar e incubar a 34-36°C por 48 horas.

### 4. Recuento

- Cada 24 horas de incubación, mediante la utilización de un cuenta colonias.
- Para colonias demasiado numerosas o incontables se realiza un conteo en tres cuadrantes del círculo del cuenta colonias y se saca un promedio y éste se multiplica por 65 (área de la caja Petri).
- Calcular el valor de UFC/ml de las bacterias en estudio empleando la Ec. 1:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} \times \text{el factor inverso de la dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}} \quad [\text{Ec. 1}]$$

## H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

### 1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

La velocidad específica de crecimiento de *L. casei* con el uso de distintos sustratos y condiciones se determinó a través de ecuaciones de crecimiento.

Tomando en cuenta que el crecimiento bacteriano sigue una relación exponencial de primer orden, esto es, que por cada célula que se divida se originan dos

nuevas. De esta forma se puede afirmar que el crecimiento bacteriano se comporta de acuerdo a la siguiente relación:

$$N = 2^n \quad [\text{Ec. 2}]$$

Donde N es el número de células y n el número de duplicaciones que han tenido lugar.

Si asumimos que  $N = N_f$  en determinado tiempo  $N_{f(t)}$ , entonces  $N_{f(t)}$  es dependiente del número inicial de células ( $N_0$ ) y del número de divisiones que haya tenido lugar en ese intervalo de tiempo  $n(t)$ , de esta forma si reordenamos la ecuación 1, obtenemos la siguiente expresión matemática que rige el crecimiento bacteriano en función del tiempo:

$$N_f = N_0 \cdot 2^n \quad [\text{Ec. 3}]$$

Si  $x(t)$  es una variable tiempo-dependiente que describe la variación de cierta sustancia, como biomasa o concentración de la célula. La velocidad instantánea del proceso es la derivada de  $x(t)$ :  $dx(t)/dt$ . La velocidad específica,  $\mu(t)$ , se define como:

$$\mu(t) = dx/dt \quad [\text{Ec. 4}]$$

Si  $x(t)$  expresa la concentración celular entonces en un cultivo bacteriano la velocidad de crecimiento es medida como el aumento absoluto en la concentración celular por unidad de tiempo, mientras que la velocidad de crecimiento específica es el incremento en la concentración celular por unidad de tiempo por célula. Una simple ecuación muestra que si  $x(t)$  es positivo entonces:

$$\mu(t) = d(\ln x(t))/dt \quad [\text{Ec. 5}]$$

Por consiguiente, la velocidad de crecimiento específica puede medirse como la inclinación de la curva de crecimiento cuando el logaritmo natural ( $\ln$ ) de  $x(t)$  se

traza contra el tiempo. Si el log10 es usado en lugar de ln, entonces la pendiente de log10 será moderada = 2,3 veces menor que la velocidad de crecimiento específico cuando empleamos el ln.

La velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) puede calcularse a través de la ecuación 4.1.

$$\mu = \ln N_f - \ln N_o / (t_f - t_o) \quad [\text{Ec. 5.1}]$$

## **2. Determinación de la viabilidad de *L. casei* (LogUFC/ml)**

Para el recuento de células viables de *L. casei* al usar diferentes sustratos y condiciones, se recurrió al método de las diluciones y plaqueo, cuyo proceso se describe a continuación:

- Tomar 1 ml de un cultivo problema bien homogenizado con una pipeta estéril y diluir progresivamente en tubos con 9 ml de agua destilada.
- A partir de la muestra anterior realizamos diluciones de:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ , mediante pipetas estériles.
- A partir de la dilución  $10^{-3}$ , tomar 1 ml y sembrar en la superficie de una caja de Petri con agar MRS, luego incubar las placas a la temperatura adecuada de crecimiento (34-36°C) durante 48 horas.
- Incubadas las placas, se cuenta el número de colonias que aparecen en cada una de ellas sacando después un promedio. Se toma en cuenta las placas que contienen entre 30 y 300 colonias solamente.
- El valor promedio del número de colonias multiplicado por el valor recíproco de la dilución correspondiente nos da como resultado el número de microorganismos por ml de la muestra problema, valores que posteriormente se expresan en Log UFC/ml:

$$N^{\circ} \text{ células viables/ml} = x \text{ colonias} * \text{factor inverso de la dilución} \quad [\text{Ec. 6}]$$

### 3. Determinación de rendimiento de biomasa $Y(X/S)$

Para conocer el rendimiento de biomasa de *L. casei* al emplear distintos sustratos y condiciones se utiliza la ecuación 7:

Rendimiento de Biomasa-Sustrato:

$$Y \left( \frac{X}{S} \right) = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [\text{Ec. 7}]$$

Donde  $Y \left( \frac{X}{S} \right)$  (g biomasa/ g sustrato) es el rendimiento biomasa-sustrato, X es la concentración final de biomasa (g/L);  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa (g/L), S es la concentración final de sustrato (g/L);  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato (g/L).

Para extraer los datos necesarios para los cálculos se utilizó el método del peso seco, para conocer la concentración de sustrato y para el cálculo de la concentración de biomasa, se empleó la relación sugerida por Iáñez, E. (2013), donde menciona que 1 mg de peso seco equivale a unas  $5 \times 10^8$  bacterias probióticas, se realizaron las respectivas conversiones para obtener la concentración en g/L de los sustratos y biomasa.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **A. EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ ) DE *L. casei*, AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS (MELAZA Y LACTOSUERO) Y CONDICIONES (AGITACIÓN Y ESTÁTICO) PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA**

Se evaluó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *L. casei*, usando distintos sustratos (melaza y lactosuero) y condiciones (agitación y estático), considerando una temperatura de experimentación de 34-36 °C, éste rango es idóneo según Ossa, J., Vanegas, M. y Badillo, A. (2010), quienes manifiestan que las bacterias ácido lácticas crecen adecuadamente bajo condiciones de temperatura entre 30 y 40°C, puesto que el consumo de los nutrientes del medio como azúcares, fósforo y nitratos se aprovechan más rápido a estas temperaturas. Todos los tratamientos estuvieron suplementados con fosfato de amonio (1% en la melaza y 0.8% en lactosuero), debido a que la concentración de compuestos de amonio (sulfato de amonio, fosfato de amonio, extracto de levadura, etc.) como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo favorece el rendimiento de ácido láctico y la velocidad de formación de ácido láctico está directamente relacionada a la velocidad de crecimiento, por ende, combinado con la lactosa del lactosuero y azúcares de la melaza aporta al crecimiento del *L. casei* (García, C., 2013).

La velocidad específica de crecimiento de *L. casei*, frente a los tratamientos: LE, LA, ME y MA, desplegaron valores medios según la prueba no paramétrica de Friedman de: 0,026; 0,052; 0,020 y 0,087 h<sup>-1</sup> (gráfico 3); de los cuales el tratamiento LA (0,052h<sup>-1</sup>) y MA (0.087h<sup>-1</sup>), presentan diferencias altamente significativas entre ellos y con los demás tratamientos (P<0,01), mientras que los tratamientos LE (0,026 h<sup>-1</sup>) y ME (0,020 h<sup>-1</sup>) comparten significancia entre ellos pero difieren significativamente del resto de tratamientos (P<0,01), como reporta el (cuadro 7).

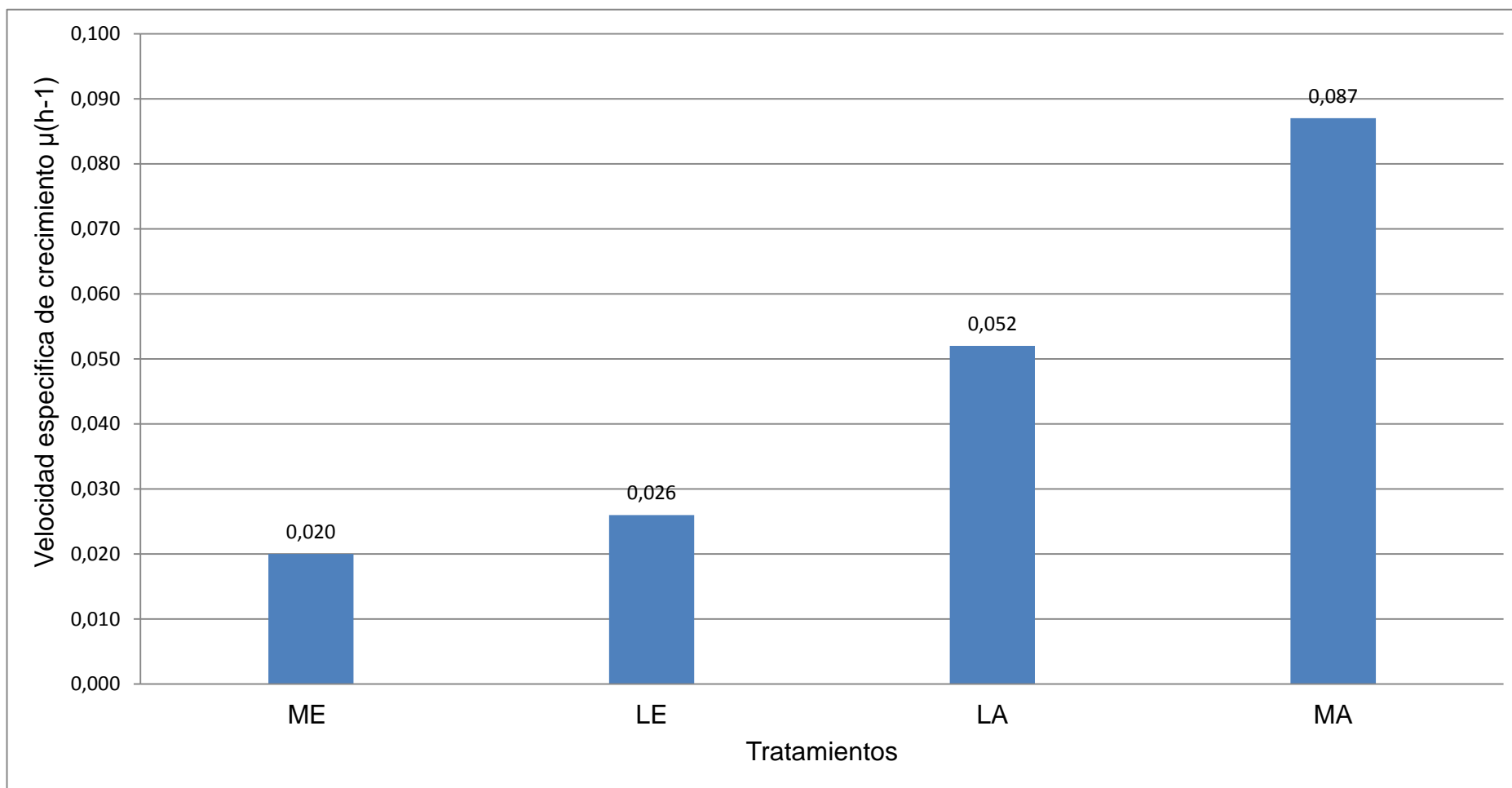


Gráfico 3: Velocidad específica de crecimiento de *L. casei*, frente a los diferentes tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA).

Cuadro 7. COMPORTAMIENTO DE *L. casei* AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS Y CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA.

TRATAMIENTO			VARIABLES			
CÓDIGO	SUSTRATO	CONDICIÓN	velocidad específica de crecimiento $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	viabilidad (Log UFC/ml)	Rendimiento de biomasa Y (x/s)	PROB.
LE	LACTOSUERO	ESTATICO	0.026 <sub>cd</sub>	7,30 <sub>b</sub>	0,16 <sub>b</sub>	0,0001
LA	LACTOSUERO	AGITACIÓN	0,052 <sub>b</sub>	7,86 <sub>a</sub>	0,26 <sub>a</sub>	0,0001
ME	MELAZA	ESTATICO	0,020 <sub>d</sub>	5,98 <sub>d</sub>	0.013 <sub>d</sub>	0,0001
MA	MELAZA	AGITACIÓN	0,087 <sub>a</sub>	6,66 <sub>c</sub>	0,11 <sub>c</sub>	0,0001

Prob. Probabilidad.

Medias con una letra común en una misma columna no son significativamente diferentes según la Prueba de Friedman ( $p < 0,01$ ).

Los tratamientos en agitación presentaron los valores más altos de crecimiento bacteriano, observándose en la melaza un crecimiento 40% mayor al del lactosuero en la misma condición. Según Kazuhiko,T. y Kozo, T.(1995),la agitación incrementa la velocidad de transferencia de nutrientes del medio a las células, mejorando la homogenización de nutrientes y aumentando la velocidad de transferencia de productos metabólicos de las células hacia el medio, en contraste con los tratamientos que permanecieron en reposo (LE y ME), los cuales presentaron los valores más bajos debido a la ausencia de movimiento de los componentes nutricionales del medio, sobre todo la melaza estática cuya velocidad de crecimiento es menor en un 77% en relación a la melaza en agitación, de esta manera se afirmaría que en el presente trabajo la melaza tuvo una dependencia directa de la agitación para procurar el crecimiento de *L. casei* el cual realiza sus actividades metabólicas mejor en condiciones de agitación, aunque esto signifique, un mayor gasto de energía al usar agitadores o biorreactores con sistemas de agitación o centrifugación.

Tomando en cuenta el factor sustrato en los tratamientos empleados podemos establecer que los mismos presentan en su composición nutrientes que han sido aprovechados por las bacterias para mantener un buen crecimiento, como asegura García, C. (2013) quien menciona que la concentración de microorganismos se muestra influido con la velocidad con que aumenta la población bacteriana, la cual para un tipo de microorganismo depende principalmente de la composición y concentración del medio de sustrato, presencia de inhibidores, temperatura y pH; en base a esto se puede deducir que se obtuvo una buena velocidad de crecimiento en el tratamiento MA, en primer lugar, porque éste medio estaba formado principalmente por melaza en un 8%, cuyo principal componente es la sacarosa (60-63%) (Vaca, R., 2011), el mismo que sufre una transformación a monómeros de azúcar (glucosa y fructosa) por la enzima invertasa, que puede disminuir su actividad a concentraciones altas de sustrato, a determinadas temperaturas y Ph, permitiendo el aumento de la velocidad de crecimiento (Kazuhiko,T. y Kozo, T., 1995).La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), fue evaluada en la fase de crecimiento exponencial, la cual en la mayoría de los tratamientos se dio entre 24 y 48 horas de cultivo en los sustratos naturales para luego entrar en un declive progresivo de la curva de



crecimiento bacteriano (anexo 5), esta situación se dio principalmente en la melaza en agitación, debido a la baja concentración del sustrato melaza; lo que aceleró la muerte celular. El buen crecimiento en el tratamiento MA se hubiera mantenido al emplear mayores niveles de melaza, como lo hicieron Ossa, J., Vanegas, M. y Badillo, A. (2010), al emplear diferentes niveles de melaza para crecimiento de bacterias probióticas, donde un 20% de melaza fue el mejor tratamiento para obtener recuentos de hasta  $10^9$  UFC/ml. En cuanto al tratamiento LA, la velocidad de crecimiento fue un 40% menor que la MA, sin embargo, la muerte celular fue más lenta como se observa en la curva de crecimiento en el Anexo 5, esto puede atribuirse a la mayor disponibilidad de nutrientes en el lactosuero y sobre todo tomando en cuenta que el *L. casei*, por ser una bacteria ácido láctica, tienen la cualidad de fermentar la lactosa como sustrato preferencial (Jiménez, R. *et al.*, 2009). Otra característica que pudo influir en el buen crecimiento de *L. casei* en el lactosuero y su muerte tardía dentro del medio, fue la presencia de una mayor concentración de proteínas, puesto que para el lactosuero dulce se ha reportado una concentración de proteínas de 0,8-1,0 % de los sólidos totales (Chamorro, M y Losada, M., 2002).

Se midió el pH de cada tratamiento, tomando muestras de 5 ml de los Erlenmeyer cada 24 horas, y se observó un promedio global de pH inicial de 5,4 y un final de 3,8; (anexo 4), valores que coinciden con otros estudios cuando el medio de cultivo llega a la fase de desaceleración o estacionaria en el estudio cinético de crecimiento (León, D. *et al.*, (2013). Las bacterias ácido lácticas crecen adecuadamente bajo condiciones microaerófilas con cantidades de oxígeno, entre un 2 y 10%; además, en pH, donde los medios son ligeramente ácidos, en un rango de 4,5 a 6,4, bajo condiciones de temperatura entre 30 y 40°C y cuando un medio de cultivo alcanza la alcalinidad o neutralidad, el crecimiento de las bacterias tiende a disminuir Ortiz, A. *et al.* (2008). Independientemente del tratamiento utilizado, el decrecimiento progresivo de pH de casi dos unidades en el presente estudio, se debe a que la fermentación con el género *Lactobacillus* da como resultado la acidificación del medio de cultivo al producirse ácido láctico a partir de la fuente de carbono (Aguirre, E. *et al.*, 2010). El ácido láctico inhibe el crecimiento de las bacterias lácticas. Para el caso de *L. casei*, este efecto ha sido documentado (Aguirre, E. *et al.*, 2010). El ácido láctico inhibe exponencialmente la

tasa de crecimiento específica aún a concentraciones menores de 5 g/L. (Aguirre, E. *et al.*, 2010). La inhibición por ácido láctico es el factor dominante que limita el desempeño fermentativo de crecimiento de *L. casei*, lo que impide el desarrollo de mayores volúmenes de biomasa. Por ello, una alternativa para controlar los bajos pH y las condiciones de acidez de los medios producidos por el ácido láctico, es el uso de neutralizantes como el carbonato de calcio, hidróxido de calcio, carbonato de amonio, hidróxido de amonio o hidróxido de sodio, aunque las mejores alternativas son el carbonato de amonio o de calcio que conducen a la formación de sulfato de amonio o dióxido de carbono respectivamente (Serna, L. y Rodríguez, D, 2005).

El valor de velocidad específica de crecimiento de *L. casei* en el medio MA (0,087 h<sup>-1</sup>) arrojados en la presente investigación es superior a los reportados por Velásquez, J. *et al.* (2015), quienes obtuvieron un máximo valor experimental de velocidad específica de crecimiento de 0,061h<sup>-1</sup>. También el trabajo efectuado por León, D. *et al.* (2013), donde realizaron estudios cinéticos de crecimiento con diferentes formulaciones para la cepa de un lactobacilo probiótico aislado del pulque, determinándose los mejores resultados de  $\mu = 0,056 \text{ h}^{-1}$  y 0,042 h<sup>-1</sup>.

## **B. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *L. casei* (Log UFC/ml), AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS (MELAZA Y LACTOSUERO) Y CONDICIONES (AGITACIÓN Y ESTÁTICO) PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA**

El recuento de células viables (Log UFC/ml) de *L. casei*, frente a los diferentes tratamientos presentaron valores medios de acuerdo a la prueba de Friedman de: 7,30; 7,86; 5,98 y 6,66 log UFC/ml; como se ilustra en el gráfico 4, mismos que presentan diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ) entre todos los tratamientos. Estas medias corresponden a los máximos recuentos alcanzados por el microorganismo durante su crecimiento dentro de los medios de cultivo enriquecidos con los sustratos en estudio.

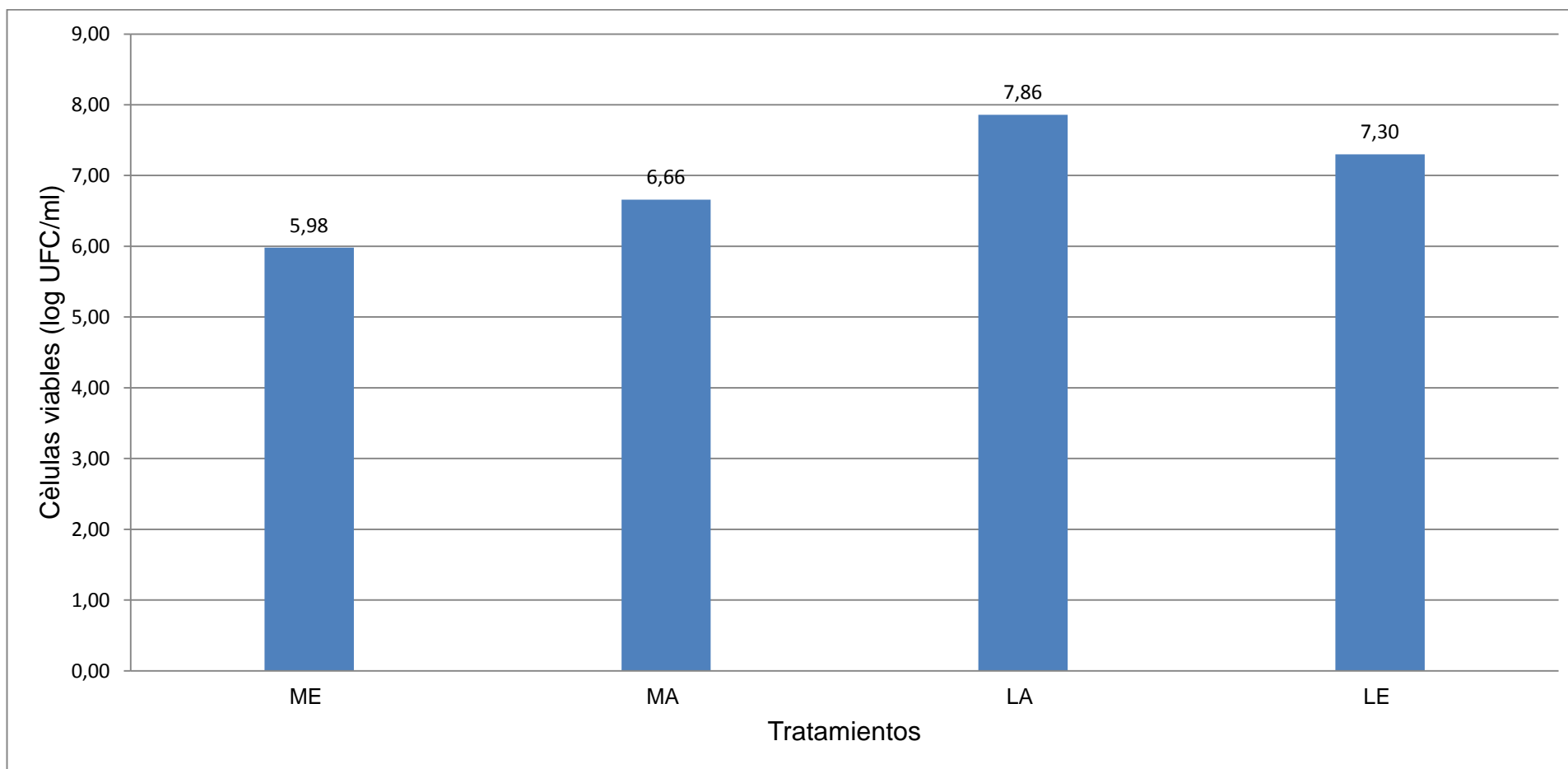


Gráfico 4: Viabilidad de *L. casei*, frente a los distintos tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA).

Los tratamientos en estado de agitación presentaron los recuentos más altos de células viables, siendo el tratamiento LA, el que tuvo recuentos cercanos a  $10^8$  UFC/ml, ya que como se mencionó anteriormente, la agitación permite distribuir los nutrientes por todo el medio, lo que facilita su consumo por parte de las bacterias, con el consecuente mantenimiento de células vivas durante el proceso fermentativo de la melaza y lactosuero.

Para garantizar recuentos viables satisfactorios, se añadió a los cultivos fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y se controló la temperatura ( $34 - 36^{\circ}\text{C}$ ), sin embargo, en este parámetro existen otros factores que influyen como el incremento en la acidez del medio durante el proceso fermentativo, el peróxido de hidrógeno producido por algunos lactobacilos, la composición de los sustratos, el antagonismo entre los microorganismos por la producción de sustancias antimicrobianas, que hacen posible el descenso en el recuento de los microorganismos (Londoño, M. *et al.*, 2008),. En el presente trabajo se observó un descenso progresivo del pH global de 5,4 hasta 3,8 lo que en parte afectó a los recuentos viables, principalmente a los tratamientos a base de melaza. El efecto del pH en la viabilidad de *L. casei* se atribuye a que su pH intracelular se mantiene a valores de 6,6 y cuando el pH del medio disminuye se origina un gradiente de pH a cada lado de la membrana celular, para bombear protones de la parte externa, la bacteria consume ATP, pero al final de la fase exponencial de crecimiento, la cantidad de ATP disponible no es suficiente, desaparece el gradiente de pH y disminuye la actividad de las enzimas proteolíticas, involucrando la inhibición de las bacterias lácticas (Briceño, A., Martínez, R. y García K. (2010). La melaza y el lactosuero fueron sometidos a un proceso de esterilización en una autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos (Aguirre, E. *et al.*, 2010) antes de la inoculación, para garantizar la ausencia de microorganismos para que no exista antagonismo ni producción de sustancias antimicrobianas.

La presencia de lactosa y proteínas en el lactosuero hace que las bacterias se mantengan vivas por más tiempo, y la muerte celular también está ligada al agotamiento o disminución de uno de los nutrientes; situación que se evidenció en nuestro trabajo, puesto que los recuentos en LA se mantuvieron similares durante todas las fases de crecimiento bacteriano (anexo 5). La melaza estática arrojó la

menor viabilidad, en un 24% menor con respecto a LA, esto puede ser debido a la baja concentración de azúcares en el medio, situación que se puede corroborar con Ossa, J., Vanegas, M. y Badillo, A. (2010), quienes evaluaron el crecimiento de *L. plantarum* con diferentes concentraciones de melaza en agitación, donde observaron recuentos viables de  $10^9$  UFC/ml en 20% y 25% y se obtuvo recuentos más bajos de  $10^6$  y  $10^7$  UFC/ml, con las demás concentraciones (5%, 10%, 30%), comparado con la concentración de melaza empleada en el presente trabajo (8%), es bastante bajo y en consecuencia la producción de biomasa se ve limitada por deficiencia de fuentes de carbono y la falta de agitación; en contraste, se tuvo buen crecimiento ( $\mu$ ) en el tratamiento ME, debido a que las bacterias aprovecharon los nutrientes presentes, pero al escasearse la fuente de carbono entraron rápidamente a la fase de latencia y muerte escaseándose la producción de biomasa. El exceso o deficiencia de sustrato puede influir en los bajos recuentos celulares (Ossa, J., Vanegas, M. y Badillo, A., 2010),

Se han realizado trabajos similares para evaluar la viabilidad de varias cepas probióticas, como el desarrollado por Pérez, H y Hernández, M (2015), donde evaluaron las potencialidades del uso de sustratos a partir de jugo de Aloe vera (sábila) y coproductos azucareros (glucosa y melaza) para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* LB/103-1-5 y obtuvieron una viabilidad superior a 9,0 log UFC/ml. Se Obtuvieron recuentos de células viables de  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC/ml en muestras tomadas a las 72 horas en estudios realizados por Velásquez, J., Giraldo, G., y Padilla, L. (2012), en el que evaluaron la viabilidad de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo. Pese a que los datos reportados por estos trabajos están por encima de los presentados en la presente investigación, Aguirre, E. et al. (2010), recomiendan que la viabilidad debe ser mayor a 6,0 Log UFC/ml para que el microorganismo pueda ser empleados como cultivo probiótico, de igual modo, Tamime, A., Marshall, M. y Robinson, R. (1995), afirman que la flora probiótica, debe sobrevivir en los productos fermentados, soportar el pH ácido del estómago y sobrevivir y, si es posible, implantarse y multiplicarse en el intestino; en base a lo mencionado se podría deducir que el tratamiento LA con 7,86 Log UFC/ml, se encuentra dentro de estos parámetros, de esta manera los microorganismos cultivados en estos sustratos pueden emplearse como bacterias

probióticas en el desarrollo de alimentos funcionales donde la supervivencia de la cepa de *L. casei* y, por tanto, la vida útil del producto, dependerán entre otros factores, del contenido de ácido (alrededor de 0,65% de ácido láctico) y de una temperatura de conservación menor de 5°C (Tamime, A., Marshall, M. y Robinson, R.,1995).

### **C. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA $Y_{x/s}$ DE *L. casei* AL USAR DISTINTOS SUSTRATOS (MELAZA Y LACTOSUERO) Y CONDICIONES (AGITACIÓN Y ESTÁTICO) PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA**

El rendimiento de biomasa probiótica  $Y_{x/s}$  de *L. casei*, frente a los distintos tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA), presentaron valores medios de rendimiento, según la prueba no paramétrica de Friedman de: 0,16; 0,26; 0,013; y 0,11  $Y_{x/s}$  (g de biomasa/g de sustrato) ; como se ilustra en el gráfico 5, mismos que difieren significativamente ( $P < 0,01$ ) entre todos los tratamientos.

El lactosuero en agitación tuvo el mejor comportamiento en cuanto a rendimiento de biomasa ( $0,26 \text{ g.g}^{-1}$ ), nuevamente queda demostrado la importancia de la agitación para el desarrollo favorable de las bacterias lo cual contribuye a la producción de mayores densidades de biomasa, no sólo por la dispersión de nutrientes, sino porque favorece la correcta oxigenación del medio, ayuda a homogenizar las condiciones de temperatura y pH, la dispersión de líquidos inmiscibles y la suspensión de sólidos (Kazuhiko, T. y Kozo, T.,1995). Un factor que afecta a la producción de biomasa es la viscosidad (medida de la capacidad que un material tiene para fluir) del medio y que Según Galindo, E., Peña, C. Y Serrano, L. (2007), la viscosidad de los cultivos microbianos se ve afectada por la composición del medio (sólidos solubles), del tipo de microorganismo (hongos filamentosos, bacterias productoras de antibióticos, bacterias ácido lácticas, etc.) y de los metabolitos que producen ciertos hongos o bacterias (polímeros, goma xantán, etc.), que constituye una dificultad técnica al momento de cultivar microorganismos en un medio adecuado.

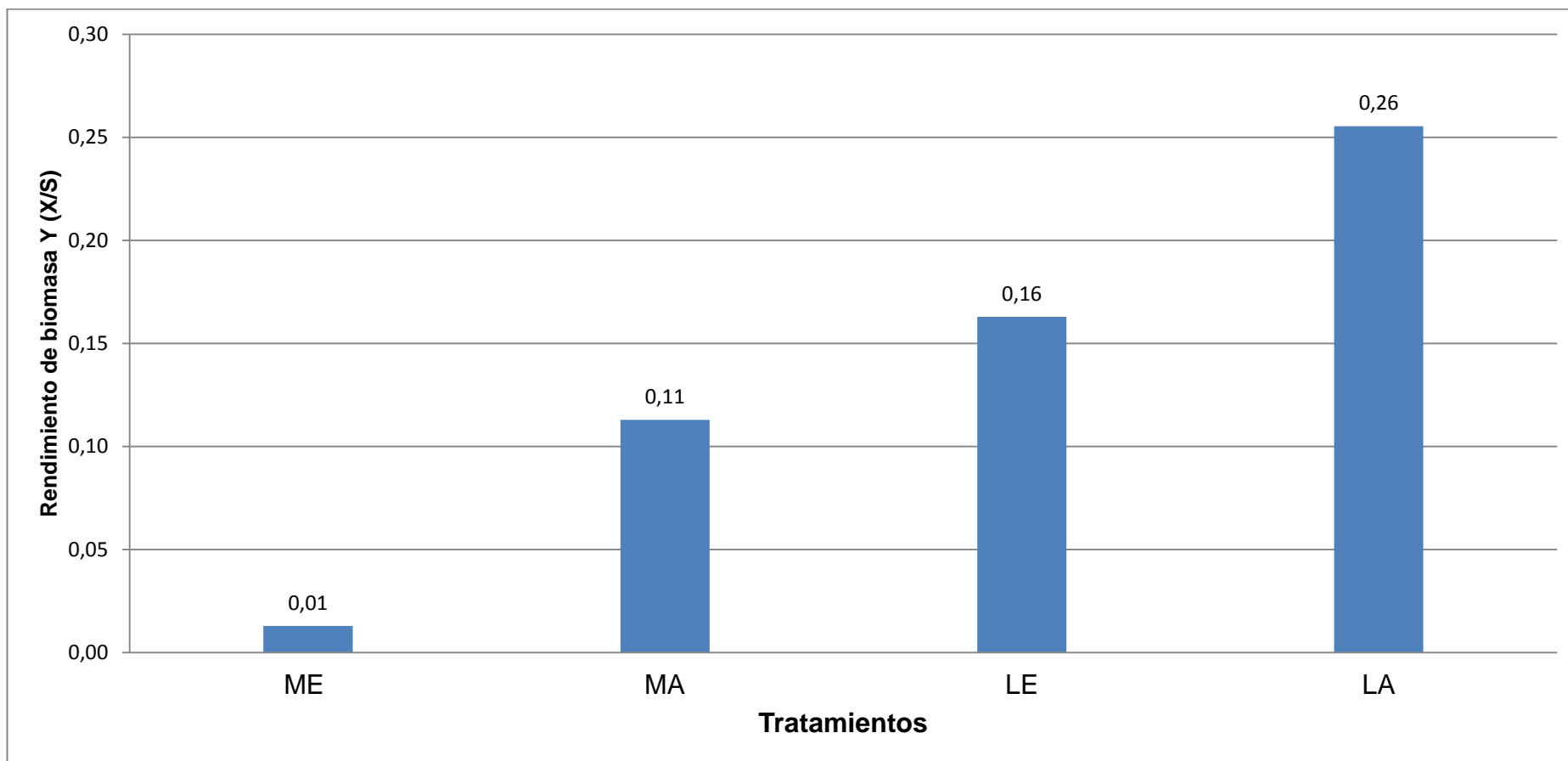


Gráfico 5: Rendimiento de biomasa probiótica  $Y_{x/s}$  (g de biomasa/g de sustrato) de *L. casei*, frente a los distintos tratamientos: lactosuero estático (LE), lactosuero en agitación (LA), melaza estático (ME) y melaza en agitación (MA).

En caso de presentarse viscosidad en el medio de cultivo o sustrato, se puede controlar al adicionar agitación al fluido ya que este movimiento físico permite disminuir la viscosidad del medio. En la presente investigación sin embargo, podemos observar que el mayor componente de los sustratos formulados es el agua, que tiene baja viscosidad, pero supondría un problema cuando se incrementen los niveles de melaza en agitación ya que posee una alta viscosidad (500 – 2700 centipoise a 30°C) en relación al lactosuero.

Galindo, E., Peña, C. Y Serrano, L. (2007), también nos menciona que para optimizar los rendimientos de biomasa se debe lograr que todo (o la mayoría) del volumen del caldo de fermentación se encuentre bien mezclado puesto que si no mezclamos bien el líquido existirán zonas “muertas” (de poca o nula agitación), lo que conducirá a un menor rendimiento y lo recomendable para tener una eficiente agitación en biorreactores es el uso de impulsores de diámetro grande (aunque de giro lento) antes que los pequeños (de giro rápido), que son lo que se usan en la mayor parte de los procesos de fermentación industrial.

En definitiva, las células dentro de un biorreactor pueden tener diferentes comportamientos, tanto en su morfología como en su fisiología, dependiendo de las condiciones hidrodinámicas en las cuales se cultiven, es así que Bustamante, *et al.* (2014), concluyeron que la agitación fue un parámetro importante para obtener una producción de biomasa de 4,5 g/La 43°C.

La presencia de fosfato de amonio añadido en los medios es un factor que se debe tomar en cuenta ya que según García, C. (2013), quien observó un aumento en la producción de biomasa al suplementar los medios con fosfato de amonio y lactosa, pero el exceso o deficiencia de estos afectaba a los rendimientos de biomasa; el empleo de lactosa como una fuente extra de carbono es favorable cuando el objetivo es obtener buen crecimiento bacteriano pero no cuando se requiere obtener ácido láctico, por lo que se rescata la importancia de utilizar fuentes de nitrógeno y carbono de manera equilibrada (para la producción de biomasa o ácido láctico). En la presente investigación no se utilizó fuentes adicionales de carbono ya que sólo se consideró las ya presentes en los sustratos naturales, pero se equilibró con fosfato de amonio (0,8% en el lactosuero y 1 % en



la melaza); observando así que hay productividad con menores concentraciones de fosfato de amonio, por lo que se sugiere que el lactosuero y la melaza son capaces de permitir el crecimiento bacteriano por sí solos. En los medios LA y LE el incremento de biomasa está asociado al consumo de lactosa, por lo tanto se puede concluir la concentración celular tiene una relación directamente proporcional a la producción de ácido láctico, mostrando un comportamiento típico de este tipo de metabolito primario asociado al crecimiento microbiano.

Los coeficientes de rendimiento de biomasa bacteriana  $Y_{x/s}$  obtenidos en la presente investigación (0,16 - 0,26 g.g<sup>-1</sup>), son similares a los obtenidos por García, C. (2013) con un rendimiento de 0,15 - 0,25; donde cultivó *L. casei* en lactosuero suplementado con lactosa y sulfato de amonio, también Aguirre, E. *et al.* (2010), reportaron un valor global promedio de rendimiento de biomasa  $Y_{x/s}$  de *L. casei* que sitúa en 0.0990 y 0.1060 (g.g<sup>-1</sup>) al usar suero de leche de cabra clarificado como fuente de carbono.

#### **D. ANÁLISIS ECONÓMICO**

Para determinar los costos de producción de la obtención de biomasa bacteriana con el uso de distintos sustratos, se calculó la cantidad de materiales directos, mano de obra directa y costos indirectos de producción, que son los datos que abarcan los costos de producción los cuales se describen detalladamente en el anexo 8.

Todos los costos de producción se proyectaron para un año, con una capacidad de producción de la planta de 150 g de biomasa probiótica de *L. casei* al día, a una escala piloto de 50 litros de medio de cultivo.

Al analizar el beneficio/costo, se determinó que al utilizar el tratamiento a base de lactosuero en agitación (LA), se obtuvo una rentabilidad de 63% o lo que es lo mismo una utilidad de 0,63 centavos por cada dólar invertido, seguido del tratamiento con lactosuero estático (LE), con una utilidad de 0,01 centavos por cada dólar invertido (cuadro 8).

**Cuadro 8: ANÁLISIS ECONÓMICO DEL USO DE DISTINTOS SUSTRATOS PARA EL DESARROLLO DE BIOMASA BACTERIANA, PROYECTADOS PARA UN AÑO, A ESCALA PILOTO (50 Lt DE MEDIO DE CULTIVO)**

CONCEPTO	Unid.	Cantidad	C. U.	LA	LE	MA	ME
<b>MATERIALES DIRECTOS</b>							
Lactosuero	Lt	91779,84	0,05	4588,99	4588,99	....	....
Melaza	Lt	7401,60	0,35	....	....	2590,56	2590,56
Inóculo	gr	46,26	2,00	111,02	111,02	111,02	111,02
Fosfato de amonio (lactosuero)	gr	740,16	0,02	14,80	14,80	....	....
Fosfato de amonio (melaza)	gr	925,20	0,02	....	....	18,50	18,50
Agua destilada	Lt	84193,20	0,35	....	....	29467,62	29467,62
Subtotal	\$			4714,82	4714,82	32187,71	32187,71
<b>MANO DE OBRA</b>							
DIRECTA	Jornal	2,00	6206,63	12413,26	12413,26	12413,26	12413,26
<b>COSTOS INDIRECTOS DE PRODUCCION</b>							
	\$			22283,95	22283,95	22283,95	22283,95
<b>EGRESOS</b>							
TOTALES	\$			39412,03	39412,03	66884,91	66884,91
<b>Biomasa obtenida (laboratorio)</b>							
	g			2,50	1,55	0,99	0,82
<b>Biomasa obtenida (piloto)</b>							
	g			32125,00	19891,80	12682,95	10524,15
<b>Costo por gramo de biomasa</b>							
	\$			1,23	1,98	5,27	6,36
<b>Precio de venta/g</b>							
	\$			2,00	2,00	2,00	2,00
<b>Ingresos totales</b>							
				64250	39783,6	25365,9	21048,3
Beneficio/Costo	B/C			1,630	1,009	0,379	0,314

La mejor alternativa es el tratamiento con el mayor rendimiento de biomasa (LA), lo que conlleva a tener mayores ingresos. Según menciona Alba, D. (2015), un proyecto debe aceptarse cuando el  $B/C > 1$ , lo que indica que existen ganancias. En cambio, los tratamientos a base de melaza (MA Y ME), presentaron un  $B/C > 1$  (MA: 0,38 y ME: 0,31), que financieramente representan pérdidas por lo tanto estos tratamientos deben rechazarse.

## V. CONCLUSIONES

1. La mayor velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *L. casei* se registró en la melaza y lactosuero en condición de agitación (MA= 0,087 y LA= 0,026 h<sup>-1</sup>), evidenciando que la agitación es la mejor condición para el crecimiento de *L. casei*; y que los microorganismos realizan sus actividades metabólicas dentro de estos sustratos, con cantidades mínimas de fosfato de amonio y con temperatura controlada entre 34-36 °C.
2. El uso de lactosuero como sustrato para el desarrollo de microorganismos probióticos, influenciado directamente por la agitación, fue el mejor tratamiento para obtener recuentos de células viables mayores a 10<sup>6</sup> UFC/ml; el cual se encuentra dentro de los parámetros establecidos para considerar al microorganismo (*L. casei*) como probiótico.
3. El mejor resultado en cuanto a rendimiento de biomasa  $Y_{x/s}$  de *L. casei*, se obtuvo con el medio a base de lactosuero y en agitación de 0,26 g.g<sup>-1</sup> y a la vez registró la mayor producción de biomasa de 2,5 g/Lt, comprobándose una vez más que el tratamiento LA, es el más idóneo para obtener biomasa bacteriana.
4. En cuanto al análisis económico, se obtuvo un beneficio costo de 1,63 en el tratamiento lactosuero en agitación; que significa que por cada dólar invertido se tiene una utilidad de 0,63 centavos de dólar, lo que indica que producir biomasa bacteriana con este tratamiento podría ser una actividad rentable.

## VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar lactosuero como sustrato natural y económico para el desarrollo de biomasa bacteriana probiótica, en condición de agitación, ya que permite un buen crecimiento bacteriano, con recuentos viables mayores a  $10^6$  UFC/ml, y rendimientos de biomasa de  $0,26 \text{ g.g}^{-1}$ .
- Mejorar las condiciones de cultivo de bacterias probióticas mediante el uso de tamponadores de pH, que permitan mantener un pH de 4,5 a 6,4; y concentraciones mayores de fosfato de amonio (2%) para obtener mayores rendimientos de biomasa, con el tratamiento lactosuero en agitación.
- Aplicar métodos de conservación para *L. casei* como liofilización o encapsulamiento y a la vez usarlos en un alimento funcional (bebidas, carnes y leches fermentadas, etc.), y analizar la vida de anaquel, mediante un estudio de la viabilidad del microorganismo dentro del producto.
- Desarrollar medios de cultivo a base de lactosuero, no solo orientado a obtener mayores densidades de biomasa bacteriana sino también a la obtención de metabolitos como ácido láctico y cítrico, además estudiar otros tipos de microorganismos como levaduras.

## VII. LITERATURA CITADA

1. AGUIRRE, E., AGUILAR, J., RAMÍREZ, A., Y ÁLVAREZ, M. (2010). Producción de Proteína y Biomasa Probiótica de *Lactobacillus casei*. Liofilizadas a partir de Suero de Leche De Cabra. Editorial Galindo. pp. 23,24. Monterrey-México.
2. ALVAREZ, D. (2004). Modelamiento del efecto de la temperatura y el ph en el Crecimiento y Producción de blis *del lactobacillus casei* y optimización de los parámetros propuestos. pp. 234, 235. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/278414362\\_Produccion\\_de\\_Acido\\_lactico\\_lactobacillus\\_casei](https://www.researchgate.net/publication/278414362_Produccion_de_Acido_lactico_lactobacillus_casei).
3. BENGMARK, S. (1996). Econutrition and health maintenance. A new concept to prevent GI inflammation, ulceration and sepsis. Clinical Nutrition 15. pp. 1-10.
4. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. (1992). Tenth Edition. The Williams & Wilkings Co. Baltimore. U.S.A.
5. BRICEÑO, A., MARTÍNEZ, R. Y GARCÍA K. (2010). VIABILIDAD Y ACTIVIDAD DE LA FLORA LACTICA (*Streptococcus salivarius ssp thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*) DEL YOGURT EN VENEZUELA. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/27038/1/24741-86799-1-PB.pdf>.
6. CASTELLANOS, M., CHAUVET, A., DESCHAMPS, A. Y BARREAU, C. (1996). PCR methods for specification and specific detection of probiotic acid lactic bacteria. Current Microbiology. Vol. 33:100-103.
7. CASTRO, G. (1993). Aprovechamiento biotecnológico de la melaza de caña de azúcar para la Producción de ácido láctico. U.A.M.
8. CHAMORRO, M., Y LOSADA, M. (2002). El Análisis Sensorial de los Quesos. pp 32,36.
9. CLARK, D., MARTINKO, J., MADIGAN, M., Y DUNLAP. P. (2007). Brock. Biología de los Microorganismos. Edit. Pearson. Disponible en:

<http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2002.%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>.

10. CÓRDOBA, R. (2013). "Metodología alternativa para la reutilización del suero de queso en base a derivados de la industria cañera". Veracruz, México. pp 16,17, 18.
11. CUELLAS, A. (2007). Introducción a los Biorreactores. Universidad Nacional de Quilmes.
12. DANONE WORLD NEWSLETTER. (1995). *Lactobacillus casei*. Disponible en: [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/mbt/santacruz\\_l\\_ya/capitulo1.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/santacruz_l_ya/capitulo1.pdf).
13. ERLOTA, R., YANTORNO, O., Y MINOGNE C. (2007). Microbiología Industrial. Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Organización de los Estados Americanos. Washington D. C. USA. Disponible en: [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/Microbiologia\\_Industrial\\_Libro.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/Microbiologia_Industrial_Libro.pdf).
14. ESTEBAN, C. (2004). Caracterización Molecular de la represión por Catabolito e Ingeniería Metabólica en *Lactobacillus casei*. Universitat de València. Disponible en: <http://www.probioticosysalud.com/tesis-doctoral/introduccion/iv-metabolismo-de-la-lactosa-y-regulacion-del-operon-lac-de-lactobacillus-casei/iv-1-transporte-y-metabolismo-de-la-lactosa-en-bacterias-lacticas/>.
15. FAO. (1985). Manual Correspondiente a la Elaboración de Quesos. Food Agricultural Organization. Disponible en: <http://www.biblioteca.ueb.edu.ec/bitstream/150>.
16. FAO. (2002). Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico. Informe. Córdoba, Argentina, 1- 4 de octubre de 2001. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>.

17. FULLER, R. (2012). Los probióticos, prebióticos, simbióticos y ¿Que está realmente creciendo en su comida? Disponible en <http://es.prmob.net/probiótico/royfuller/activia-1006520.html>.
18. GALINDO, E., PEÑA, C. Y SERRANO, L. (2007). Domesticar microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero. México. Disponible en: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_12.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_12.pdf).
19. GARCÍA, C. (2013). PRODUCCIÓN DE ACIDO L (+) LÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO UTILIZANDO *Lactobacillus casei* EN UN CULTIVO BATCH. MAESTRIA EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS. Universidad de Córdoba. Facultad de Ingenierías. Córdoba-Argentina. Disponible en: [http://www.unicordoba.edu.co/images/2\\_PRODUCCION\\_DE\\_ACIDO\\_L\\_LACTICO\\_A\\_PARTIR\\_DE\\_LACTOSUERO\\_UTILIZANDO\\_Lactobacillus\\_casei\\_EN\\_UN\\_CULTIVO\\_BATCH.pdf](http://www.unicordoba.edu.co/images/2_PRODUCCION_DE_ACIDO_L_LACTICO_A_PARTIR_DE_LACTOSUERO_UTILIZANDO_Lactobacillus_casei_EN_UN_CULTIVO_BATCH.pdf); y en <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n1/v11n1a17.pdf>.
20. GILCES, P. Y VELOZ, P. (2006). Estudio del uso de los nutrientes para la levadura en fermentación con el propósito de mejorar la producción del alcohol etílico. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química. Guayaquil, Ecuador. PP 18.
21. GUARNER, F. *et al.* (2011). Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. Disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>.
22. HARTEMINK, R., DOMENECH, V. Y ROMBOUTS, R. (1997). LAMVAB, a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. J. Microbiol.
23. HATAKKA, K., SAVILATTI, E., PONKA, A., JUKKA M., POUSSA, T., NASE, L., SAXELIN, M., Y KORPELA, R. (2006) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day carecenters: double blind, randomized trial. British Medical Journal



- (BMJ). Recuperado de:  
<http://www.redalyc.org/pdf/1698/169817981002.pdf>.
24. HOLZAPFEL, W. (2010). Introduction to pre and probiotic. Food Res. Internal. pp 963-969. Disponible en:  
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358120509487672>.
25. IÁÑEZ, E. (2013). Curso de Microbiología General. Crecimiento a nivel de poblaciones. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias. Chaco República Argentina. Disponible en:  
[http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/14\\_micro.htm](http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/14_micro.htm).
26. ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H. Y SALMEINEN, S. (2007). Probiotics. Effects on immunity Supplement to The American Journal of Clinical Nutrition. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169817981002.pdf>.
27. ISOULARI, E., ARBOLA, T., SUTAS, Y., MOILANEN, E. Y SALMEIN, S (2005). Probiotics in the management of a topic eczema. Clinical Exp. Allergy. Recuperado de:  
<http://www.redalyc.org/pdf/1698/169817981002.pdf>.
28. JIMÉNEZ, R., MAGANA, A., GONZÁLEZ, N., CHAB, C. Y ZETINA, Z. (2009). Fuentes Agrícolas y suero de queso como sustratos para la producción de Biomasa Probiótica. Tabasco-México.
29. KAZUHIKO, T.; KOZO, T. 1995. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. J. Ferment. Bioeng. 79(5):449-452.
30. KENNEDY, M. Y KROUSE, D. (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. pp 23: 456–475.
31. LEESON, S. y SUMMERS, J. (2000). Nutrición Aviar Comercial. Editorial Le'Print Club Express Ltda. Bogota, Colombia. pp 43, 44, 45.
32. LEÓN, D. *et al.* (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del

pulque. Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México.

33. LONDOÑO, M., SEPÚLVEDA, J., HERNÁNDEZ, A., PARRA, J. (2008). BEBIDA FERMENTADA DE SUERO DE QUESO FRESCO INOCULADA CON *Lactobacillus casei*. Medellín-Colombia. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/27038/1/24741-86799-1-PB.pdf>.
34. LUJÁN, M. (2007). "Bacteriofagos de *Lactobacillus casei/paracasei*. Caracterización y estudio de la fagorresistencia". Disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/128/tesis1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
35. LYONS, P. (1997). Opinión de los hombres de negocios. *Avicultura Profesional*. Vol. 15. No. 7.
36. MADRID, A. (1996). CURSO DE INDUSTRIAS LÁCTEAS. p. 261.
37. MAN, J. ROGOSA, M. Y. SHARPE, E. (1990). A medium for the cultivation of *Lactobacillus*.
38. MARDIGAN, M., MATINKO, J., PARKER, J., y BROCK, K. (2004) *Biología de los microorganismos*, 8ª ed. España. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/278414362\\_Produccion\\_de\\_Acido\\_lactico\\_Lactobacillus\\_casei](https://www.researchgate.net/publication/278414362_Produccion_de_Acido_lactico_Lactobacillus_casei).
39. MARTEAU, P.; DE VRESSE, M.; CELLIER, J. Y SCHREZENMEIR, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Supplement to *The American Journal of Clinical Nutrition*.
40. NAVA, J. (2008). Evaluación de Bacterias Ácido Lácticas Comercializadas como Probióticas. Universidad de los Andes. Departamento de Biología. Mérida – Colombia. pp 15, 16.
41. OLAGNERO, G. *et al.* (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. Buenos Aires –Argentina.
42. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (1985). *Biotecnología moderna de los Alimentos, Salud y Desarrollo Humano: estudio basado en evidencia*.

Disponible en:  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_sp.pdf).

43. ORTIZ, A.; REUTO, J.; FAJARDO, E.; SARMIENTO, S.; AGUIRRE, A.; ARBELÁEZ, G.; GÓMEZ, D.; QUEVEDO, H.B. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. Colombia.
44. OSSA, J., VANEGAS, M. Y BADILLO, A. (2010). EVALUACIÓN DE LA MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus plantarum*. Universidad de los andes. Bogotá-Cundinamarca, Colombia.
45. PARZANESE, M. (2008). Procesamiento de Lactosuero. Tecnología para Industria Alimentaria. Alimentos. MinAgri, Argentina.
46. PÉREZ, D. (2003). Tesis Doctoral “Adición de probióticos y prebióticos a fórmulas infantiles y su efecto sobre la biodisponibilidad mineral”. Murcia, España. p 61.
47. PÉREZ, H Y HERNÁNDEZ, M (2015). Evaluación de sustratos con jugo de aloe vera para el crecimiento de *lactobacillus plantarum*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. La Habana, Cuba. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v35n2/rtq03215.pdf>.
48. PÉREZ, J. Y GARDEY, A. (2010). Definición de sustrato. Disponible en:  
<http://definicion.de/sustrato/>.
49. POOLMAN, B. (1993). Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev.12:125-148. Disponible en:  
<http://www.probioticosalud.com/tesis-doctoral/introduccion/iv-metabolismo-de-la-lactosa-y-regulacion-del-operon-lac-de-lactobacillus-casei/iv-1-transporte-y-metabolismo-de-la-lactosa-en-bacterias-lacticas/>.
50. REID, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. Supplement to the American Journal of Clinical Nutrition. PP 7S:4S7-44S.

51. RIO, M., ZAGO, L, GARCÍA, H. Y BINTER L. (2007). El estado nutricional modifica la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas sobre la aparición de patologías de vías respiratorias en niños. Arch Latín Nutr. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169817981002.pdf>.
52. SALAZAR, B. Y MONTOYA, O., (2003). Importancia de los Probióticos y Prebióticos en la Salud Humana. Medellín-Colombia. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169817981002>.
53. SAMANIEGO, L. Y SOSA, M. (2002). *Lactobacillus spp.*: Importantes Promotores de Actividad Probiótica, Antimicrobiana y Bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Cuba.
54. SERNA, L. Y RODRÍGUEZ, D (2005) producción biotecnológica de ácido láctico. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Disponible en:
55. SILVEIRA, M., MONEREO, S. Y MOLINA, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? Rev. Española de Salud Pública.
56. Solis, B., Sanmartín, S., Gómez, S., Nova, E., De La Rosa B, and Macos, A. (2002). Probiotics as a help in children suffering from malnutrition and diarrhea. PP 57-59.
57. SPREER, E. (1991). Lactologia Industrial. Edit. Acribia. p 432.
58. STRAUSS, E. (2000). Fighting bacterial fire with bacterial fire. Science. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11188710>.
59. TAMIME, A., MARSHALL, M. Y ROBINSON, R. (1995). Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria.
60. TANNOCK, G. (2001). The acquisition of the normal microflora of the gastrointestinal tract. En: Human health: the contribution of microorganisms. London, Springer-Verlag. pp. 1-16.
61. VACA, R. (2011) "PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE EL USO DE *Lactobacillus rhamnosus* A PARTIR DE MELAÇA". Ambato, Ecuador. pp 28, 29, 30.

62. VARGAS, E., GÓMEZ, C., PARRA, M. Y ROMERO, M. (2010). Producción de microorganismos Probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno.
63. VELÁSQUEZ, J. *et al.* (2015) CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 EN SUERO CLARIFICADO.
64. VELÁSQUEZ, J., GIRALDO, G., Y PADILLA, L. (2012). VIABILIDAD DE *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 CULTIVADO EN SUERO DE LECHE CLARIFICADO EN UN PROCESO DE FERMENTACIÓN DISCONTINUO. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
65. VILLANUEVA, G. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso Paipa. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/278414362\\_Produccion\\_de\\_Acido\\_lactico\\_lactobacillus\\_casei](https://www.researchgate.net/publication/278414362_Produccion_de_Acido_lactico_lactobacillus_casei).

**ANEXOS**

Anexo 1: Velocidad específica de crecimiento  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) de *L. casei* al usar distintos sustratos y condiciones.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

SUSTRATO	CONDICION	REPETICIONES						SUMA	MEDIA
		I	II	III	IV	V	VI		
Lactosuero	Estático	0,016	0,021	0,018	0,012	0,066	0,023	0,156	0,026
Lactosuero	Agitación	0,067	0,038	0,042	0,051	0,055	0,058	0,310	0,052
Melaza	Estático	0,009	0,031	0,009	0,038	0,012	0,023	0,123	0,020
Melaza	Agitación	0,145	0,066	0,067	0,091	0,088	0,067	0,524	0,087

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN LA PRUEBA DE FRIEDMAN ( $p < 0,05$ )

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
ME	0,020	a
LE	0,026	ab
LA	0,052	c
MA	0,087	d
PROB.	0,0001	

Anexo 2: Viabilidad (Log UFC/ml) de *L. casei* al usar distintos sustratos y condiciones.

### RESULTADOS EXPERIMENTALES

SUSTRATO	CONDICION	REPETICIONES						SUMA	MEDIA
		I	II	III	IV	V	VI		
Lactosuero	Estático	7,29	7,15	7,57	7,09	7,37	7,32	43,79	7,30
Lactosuero	Agitación	7,98	7,79	7,98	7,72	7,98	7,72	47,17	7,86
Melaza	Estático	6,02	6,24	5,62	6,14	5,84	6,02	35,88	5,98
Melaza	Agitación	6,48	6,43	7,06	6,31	6,86	6,80	39,93	6,66

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN LA PRUEBA DE FRIEDMAN ( $p < 0,05$ )

TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
ME	5,98	a
MA	6,66	b
LA	7,86	d
LE	7,30	c
PROB.	0,0001	



Anexo 3: Rendimiento de biomasa Y (X/S) de L. casei al usar distintos sustratos y condiciones

RESULTADOS EXPERIMENTALES

SUSTRATO	CONDICION	REPETICIONES						SUMA	MEDIA
		I	II	III	IV	V	VI		
Lactosuero	Estático	0,16	0,16	0,11	0,15	0,18	0,22	0,977	0,163
Lactosuero	Agitación	0,26	0,26	0,25	0,24	0,26	0,26	1,532	0,255
Melaza	Estático	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,077	0,013
Melza	Agitación	0,14	0,14	0,12	0,08	0,13	0,08	0,677	0,113

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN LA PRUEBA DE FREEDMAN ( $p < 0,05$ )

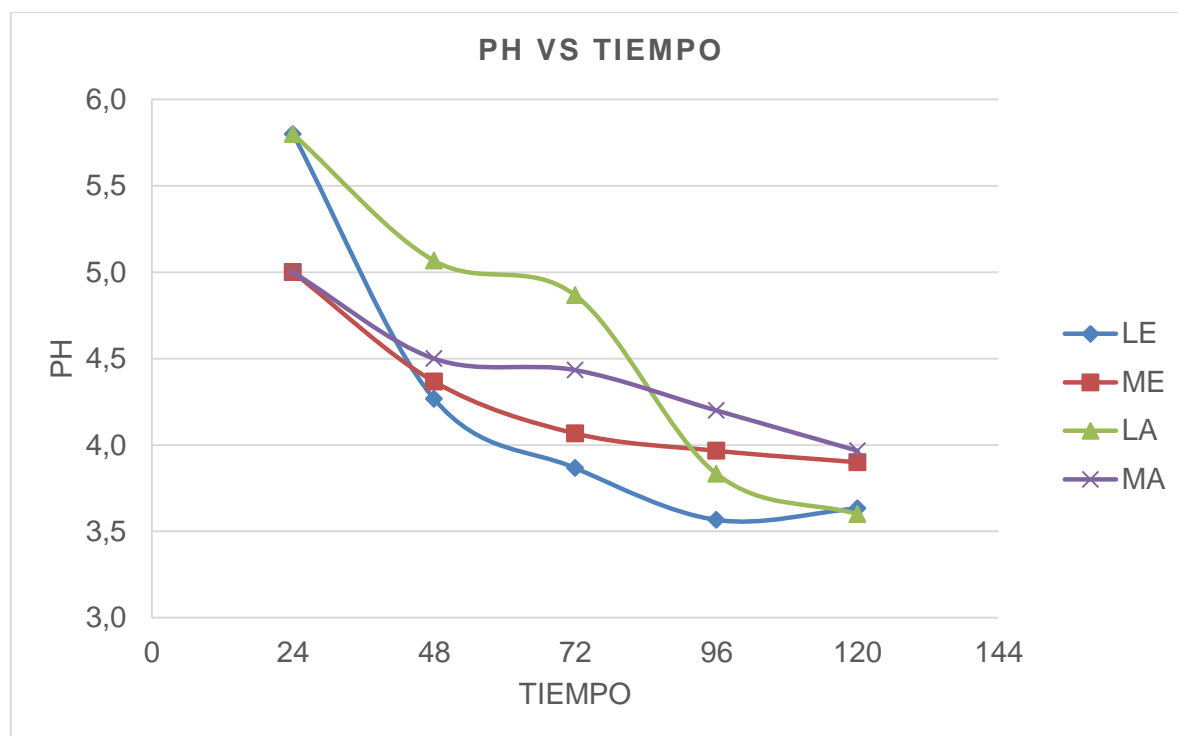
TRATAMIENTOS	MEDIA	RANGO
ME	0,01	a
MA	0,11	b
LE	0,16	c
LA	0,26	d
PROB.	0,0001	

Anexo 4: Comportamiento del pH de los tratamientos a través del tiempo, medido en muestras tomadas cada 24 horas.

#### VALORES DE pH DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

TRATAMIENTO			TIEMPO (HORAS)					
SUSTRATO	CONDICIÓN	CÓDIGO	0	24	48	72	96	120
LACTOSUERO	ESTÁTICO	LE	5,8	4,3	3,9	3,6	3,6	3,7
MELAZA	ESTÁTICO	ME	5,0	4,4	4,1	4,0	3,9	3,8
LACTOSUERO	AGITACIÓN	LA	5,8	5,1	4,9	3,8	3,6	3,6
MELAZA	AGITACIÓN	MA	5,0	4,5	4,4	4,2	4,0	4,0
MEDIA			5,4	4,6	4,3	3,9	3,8	3,8

#### GRÁFICO DEL COMPORTAMIENTO DEL PH DE LOS TRATAMIENTOS A TRAVÉS DEL TIEMPO

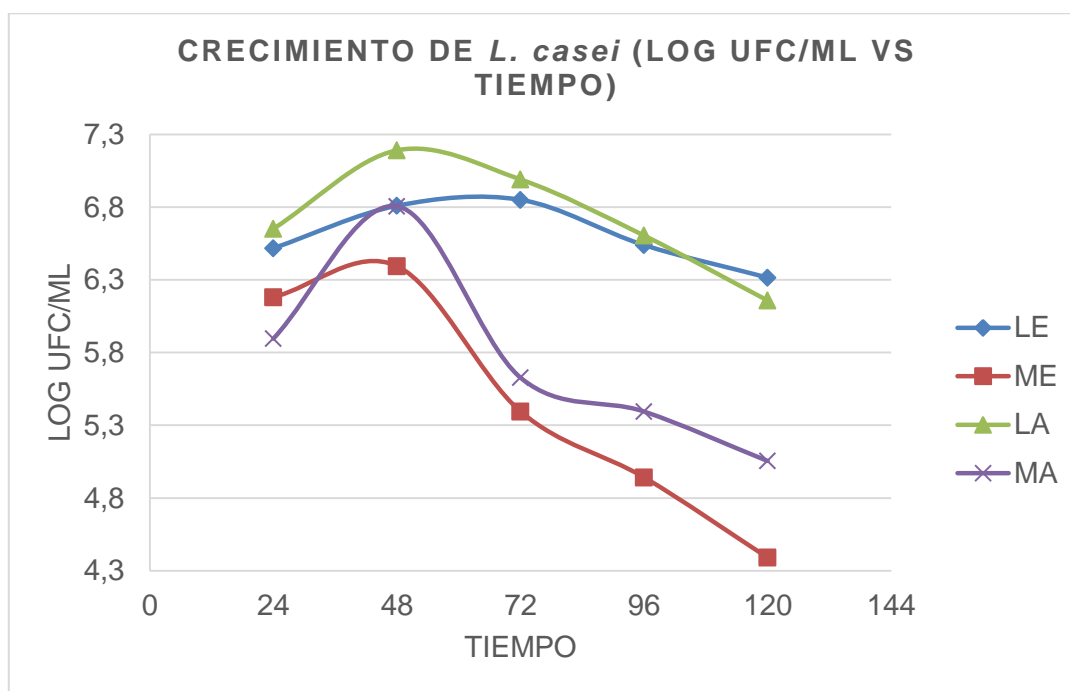


Anexo 5: Recuentos de *L. casei* (Log UFC/ml) de cada tratamiento a través del tiempo, medido en muestras tomadas cada 24 horas.

#### RECuentos Obtenidos en Cada Tratamiento (Log UFC/ml)

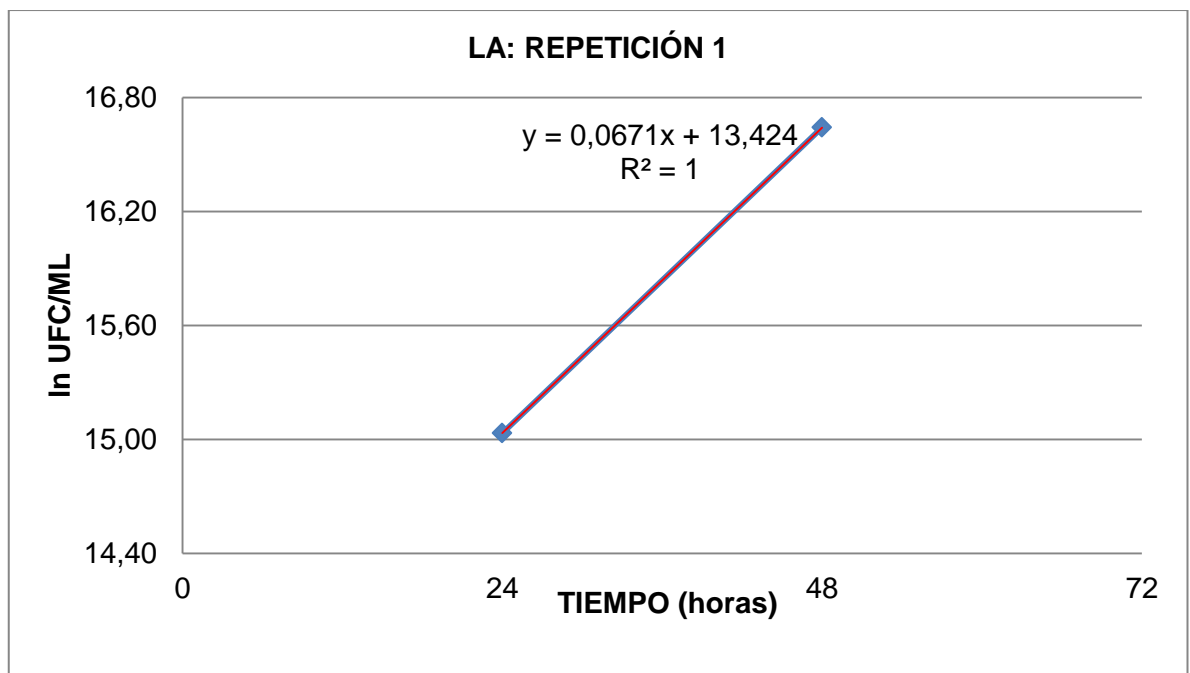
Tratamiento			Tiempo (Horas)				
Sustrato	Condición	Código	24	48	72	96	120
LACTOSUERO	ESTÁTICO	LE	6,5	6,8	6,9	6,5	6,3
MELAZA	ESTÁTICO	ME	6,2	6,4	5,4	4,9	4,4
LACTOSUERO	AGITACIÓN	LA	6,7	7,2	7,0	6,6	6,2
MELAZA	ESTÁTICO	MA	5,9	6,8	5,6	5,4	5,1

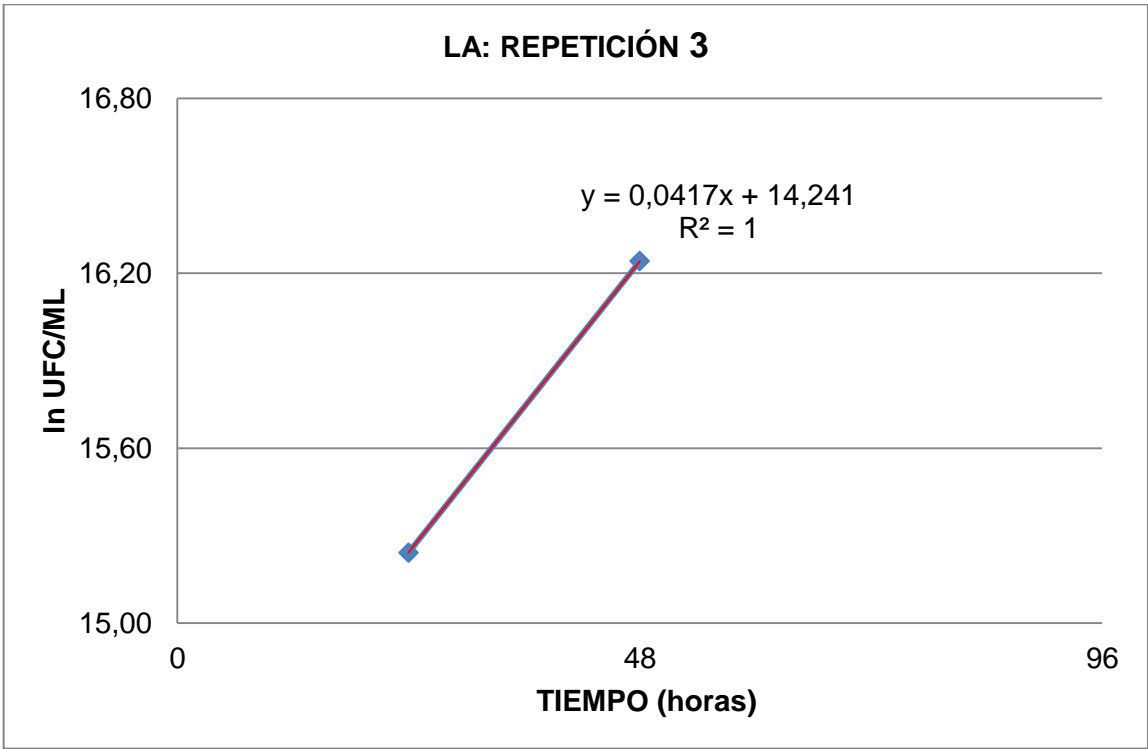
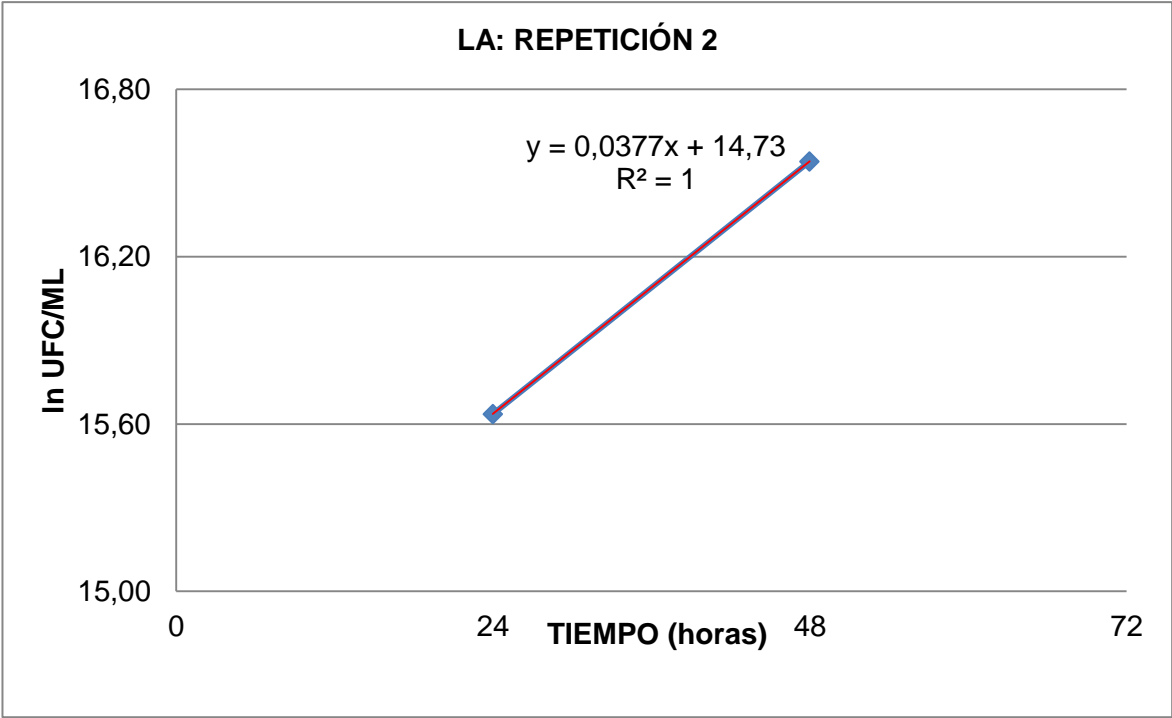
#### Curvas de Crecimiento de *L. casei* en Cada Tratamiento

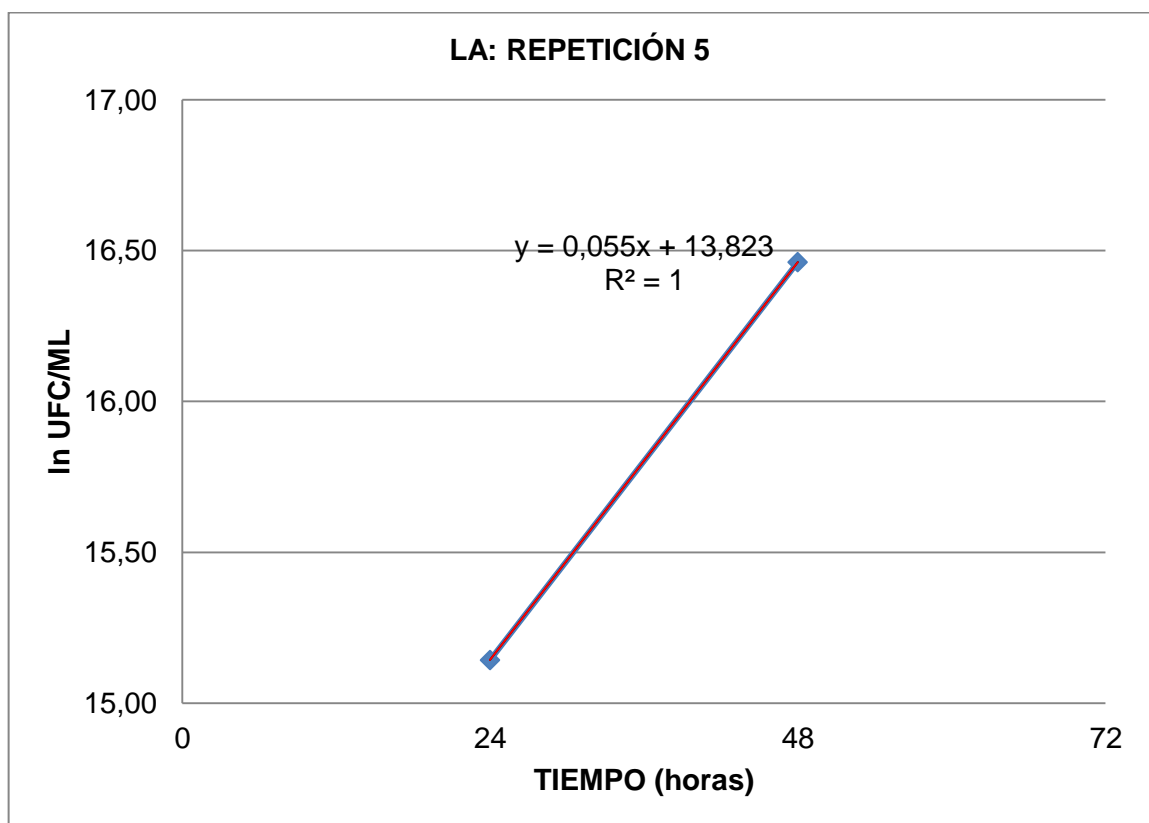
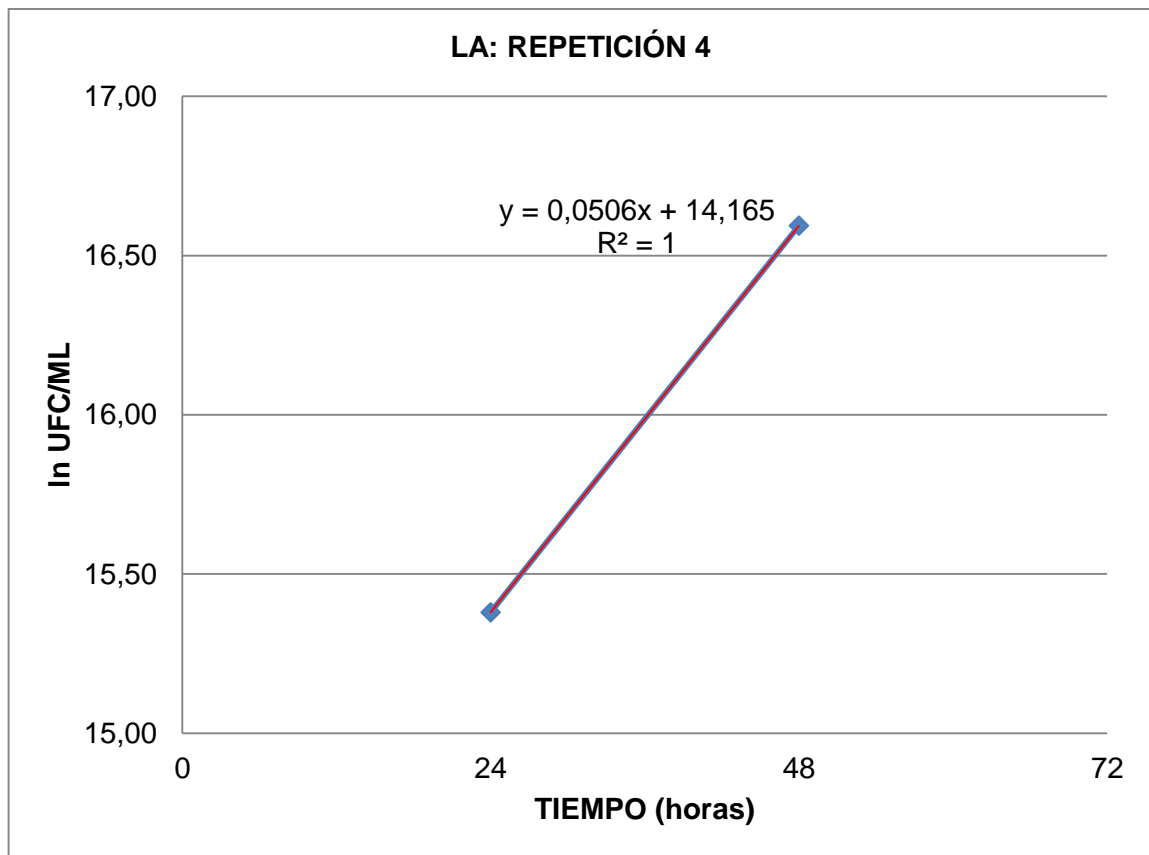


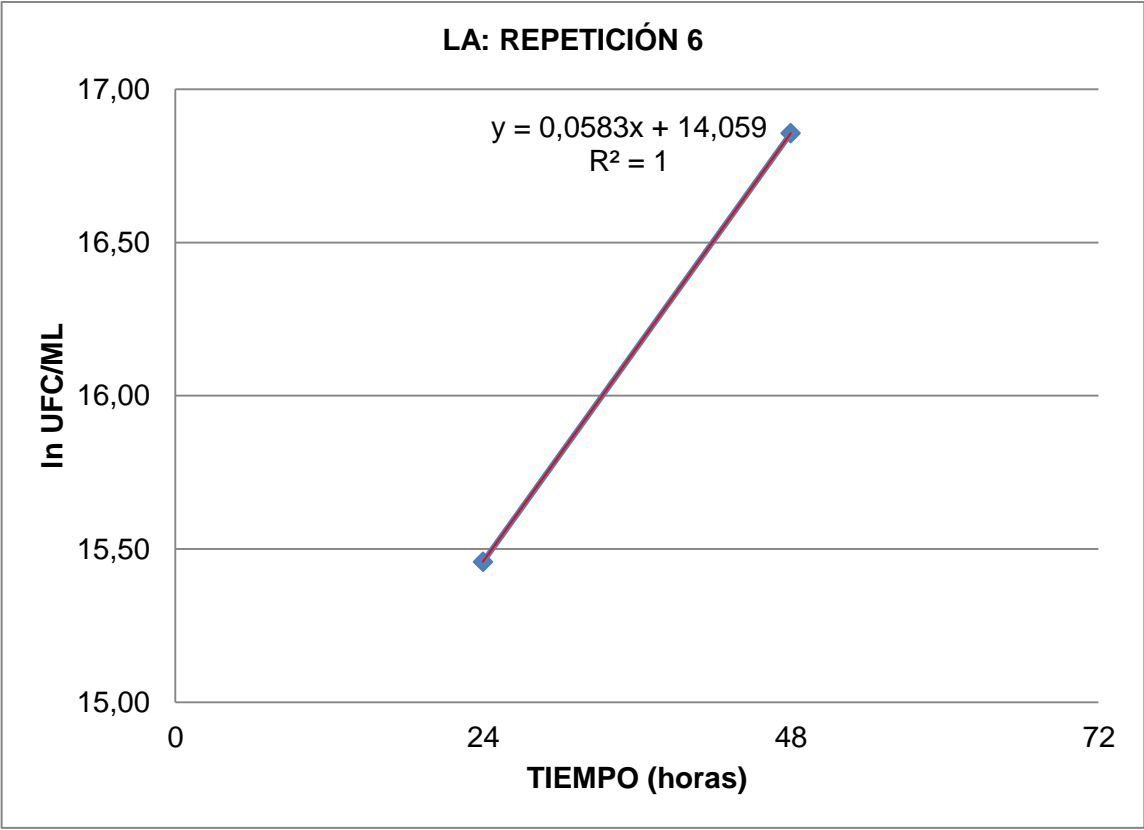
Anexo 6. Gráficos de pendientes de la curva de crecimiento en la fase de crecimiento exponencial para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento de *L. casei*.

#### LACTOSUERO EN AGITACIÓN (6 REPETICIONES)

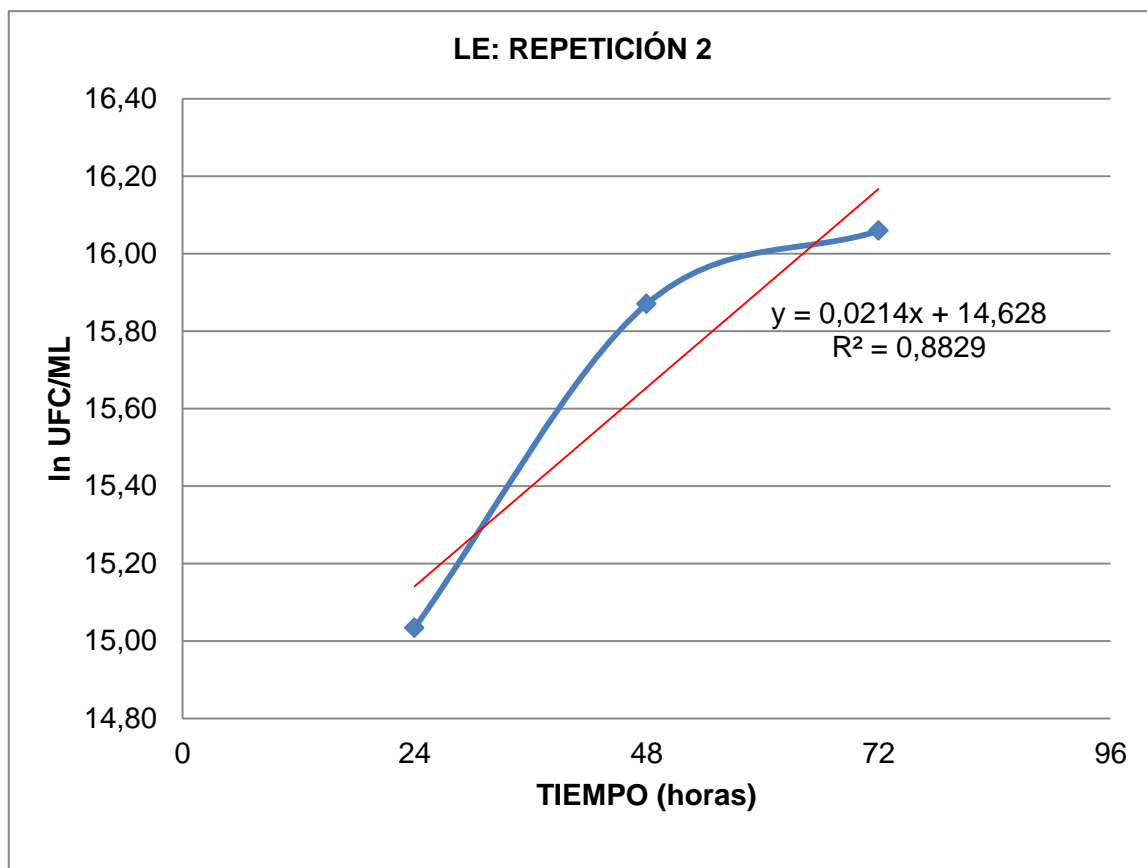
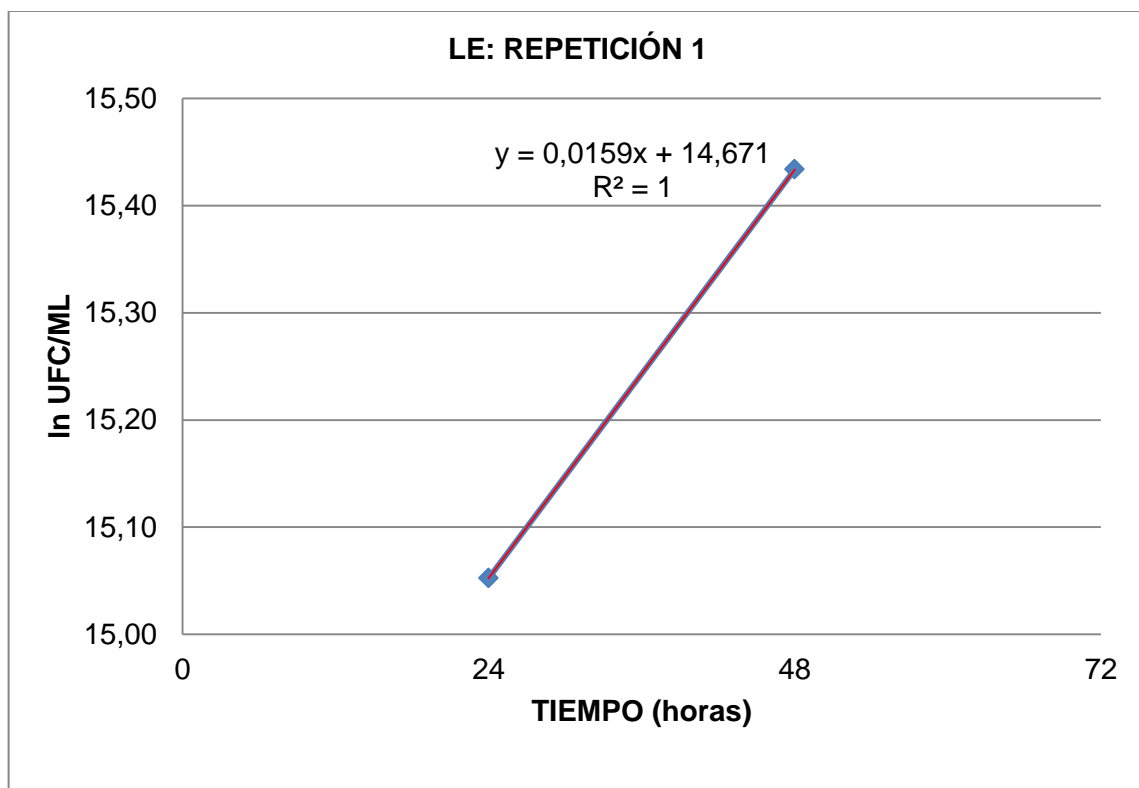




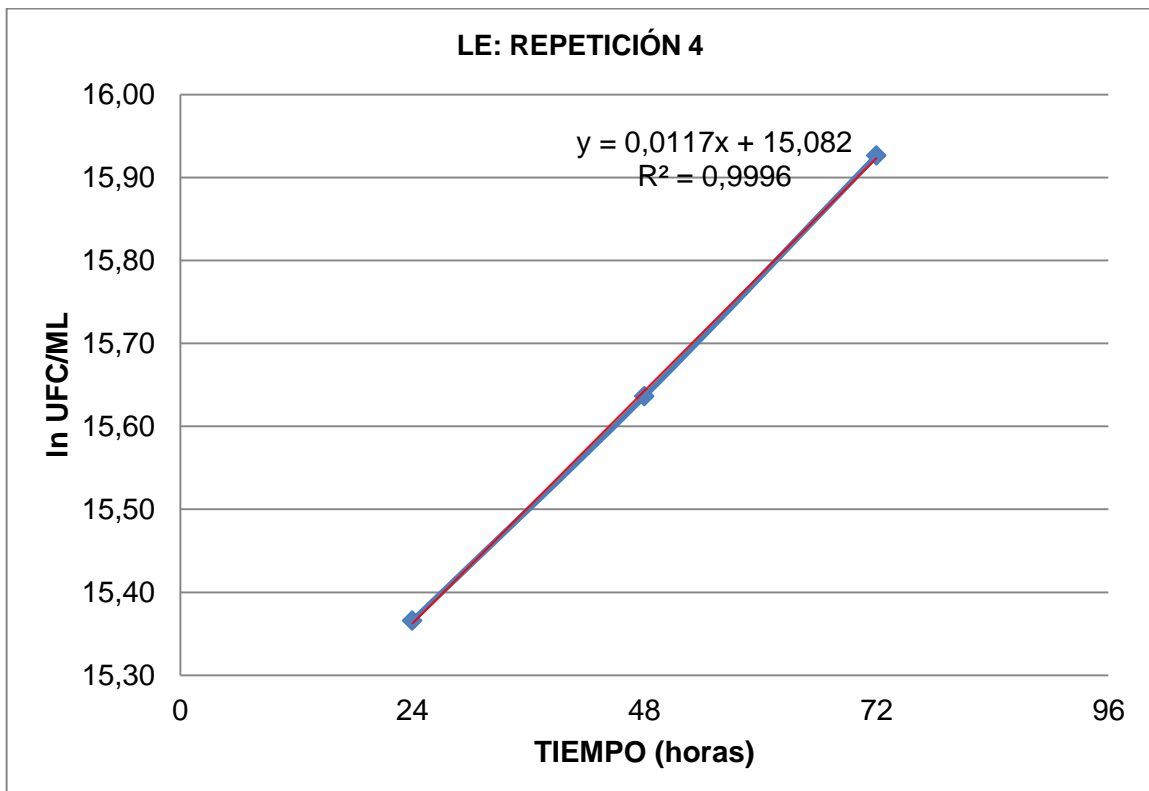
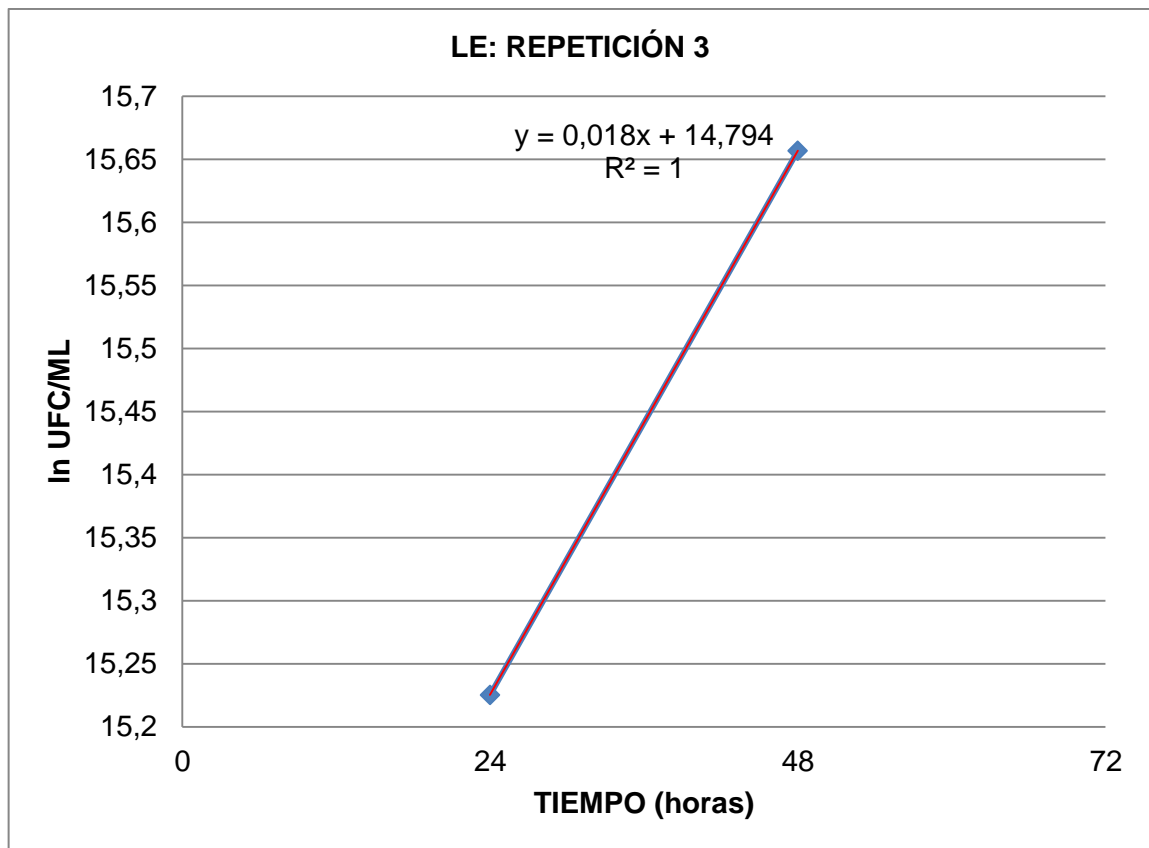


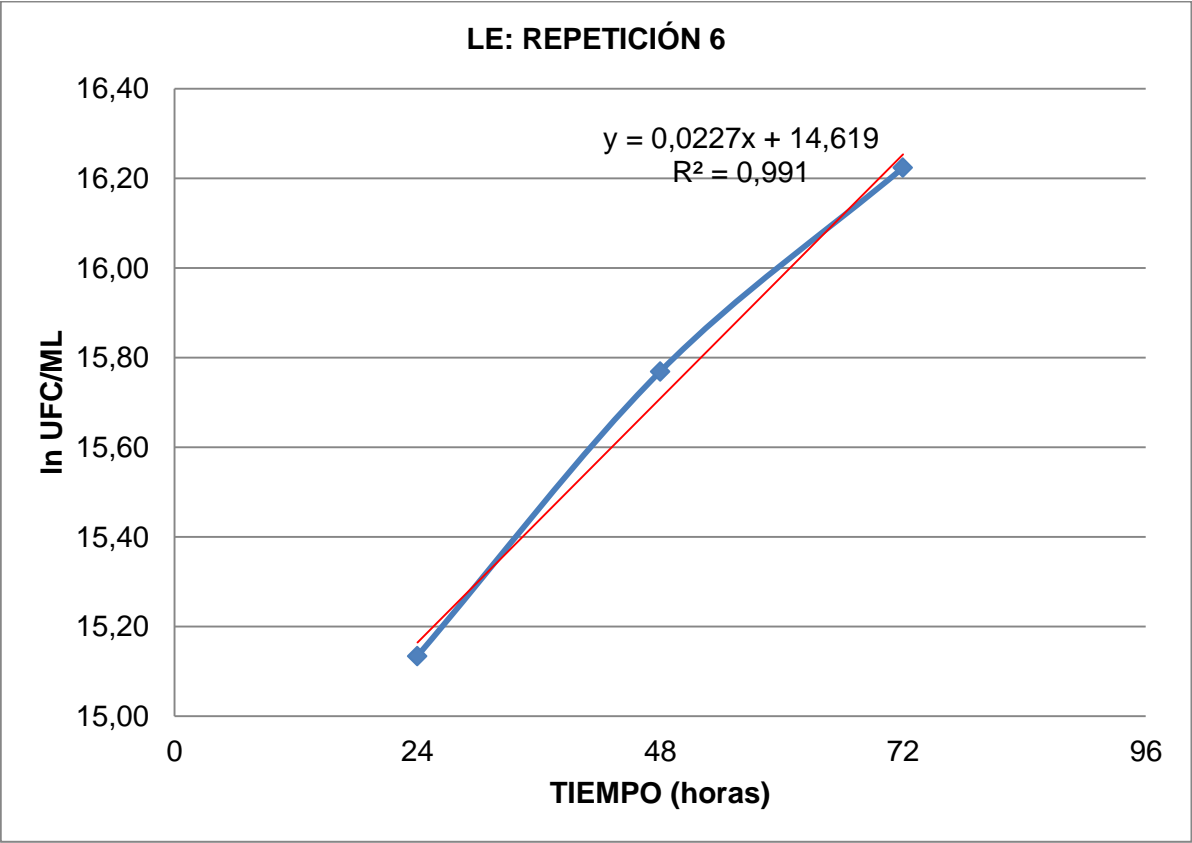
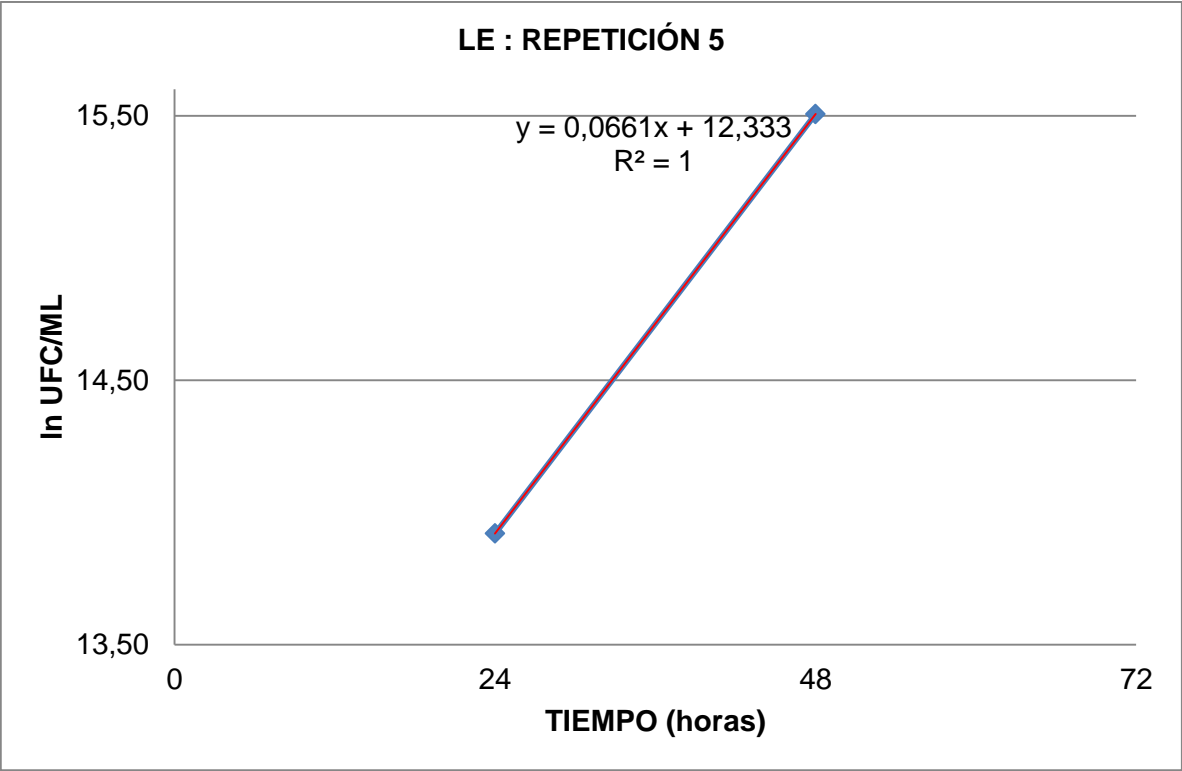


## LACTOSUERO ESTÁTICO (6 REPETICIONES)

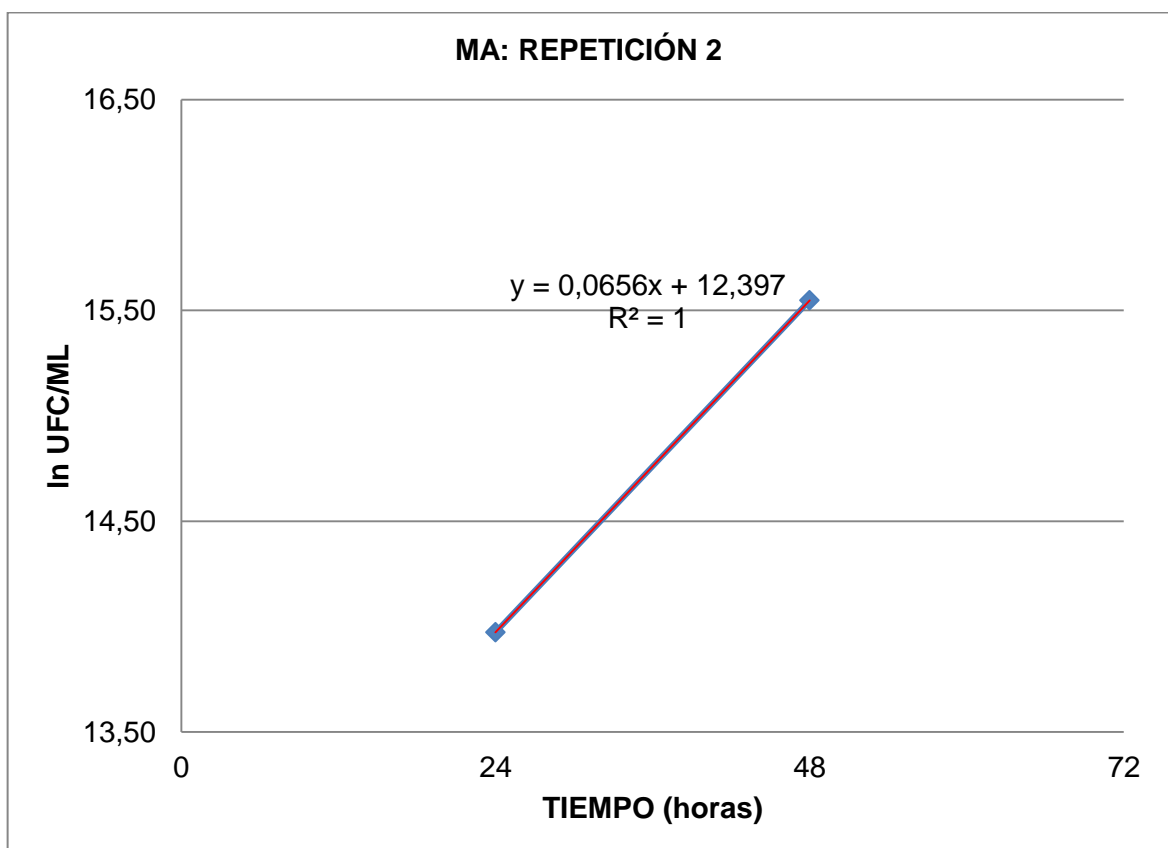
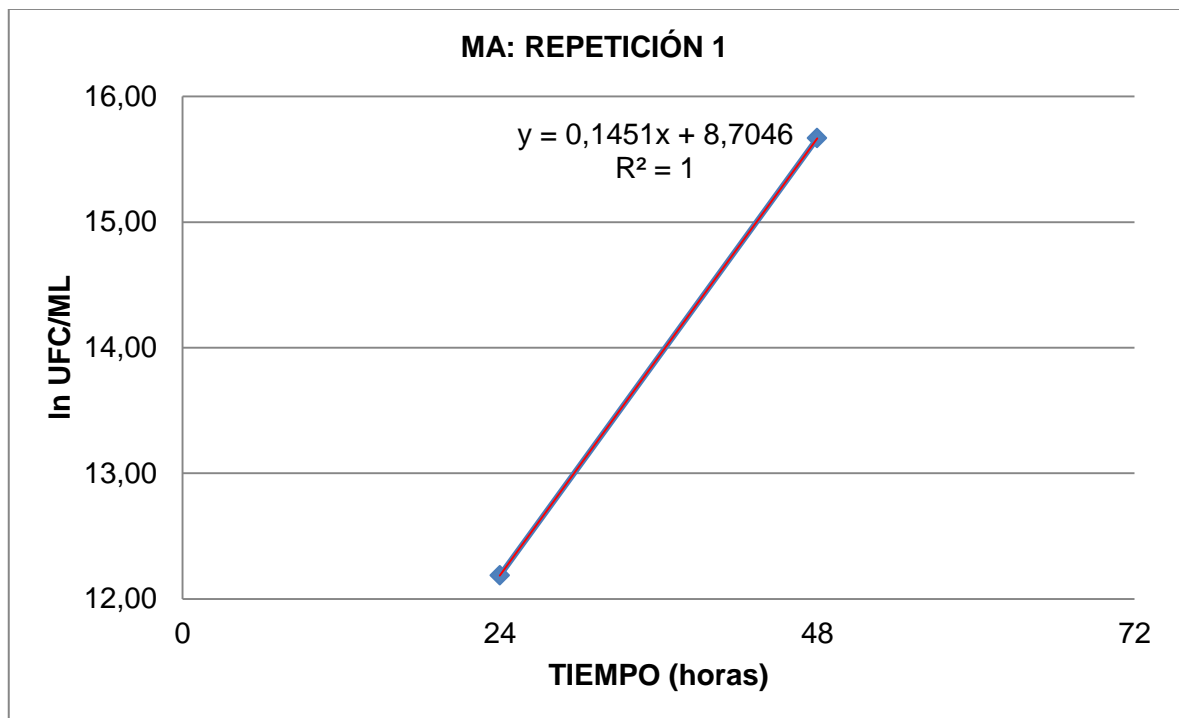


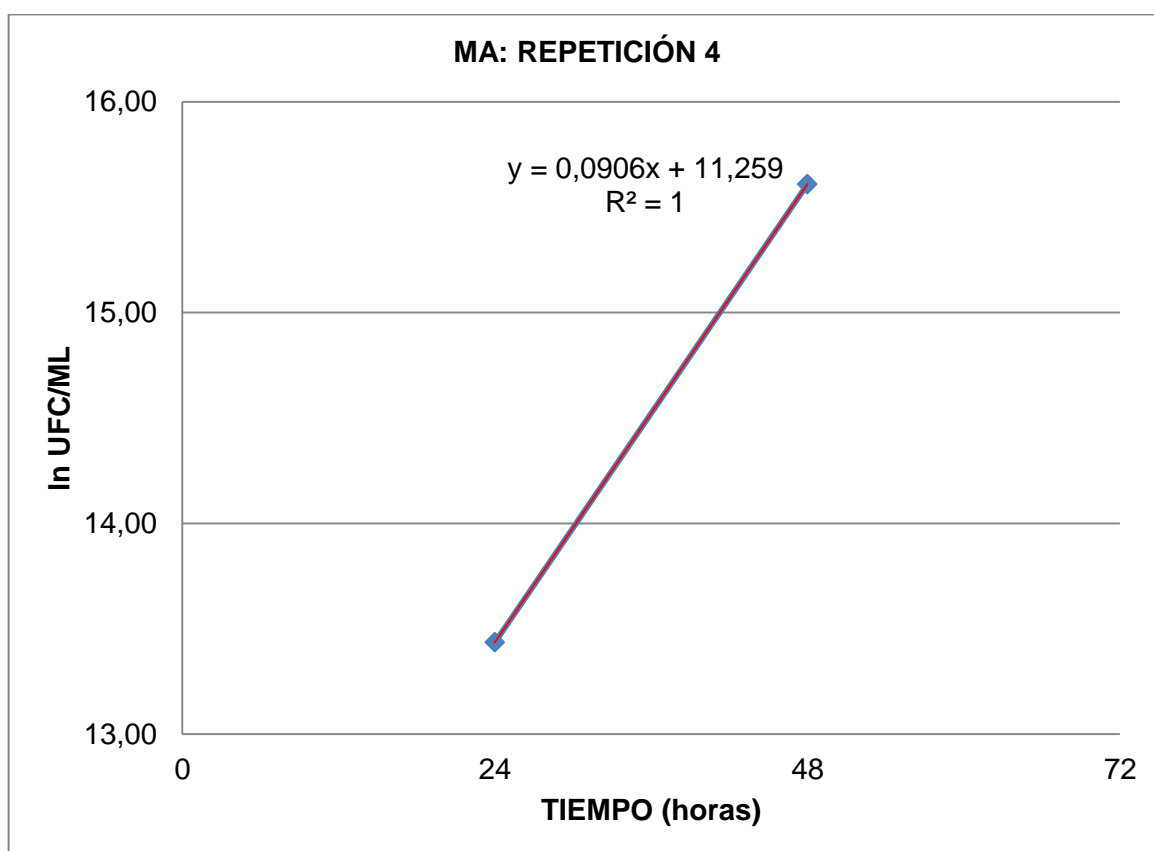
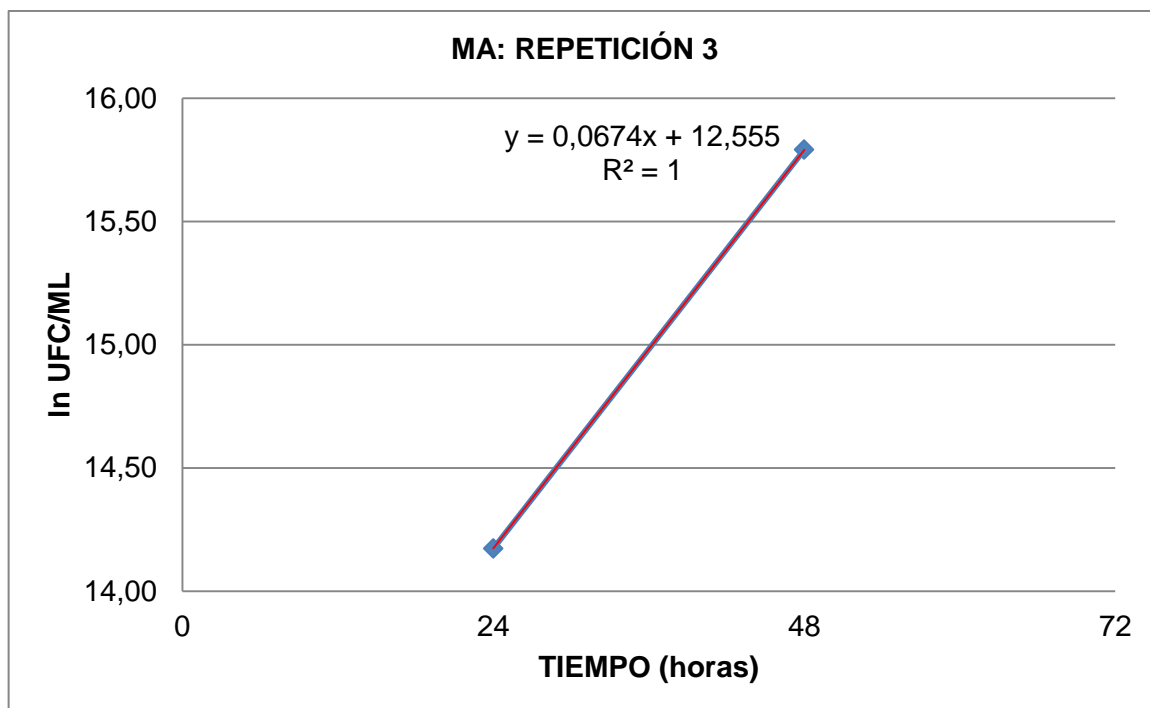


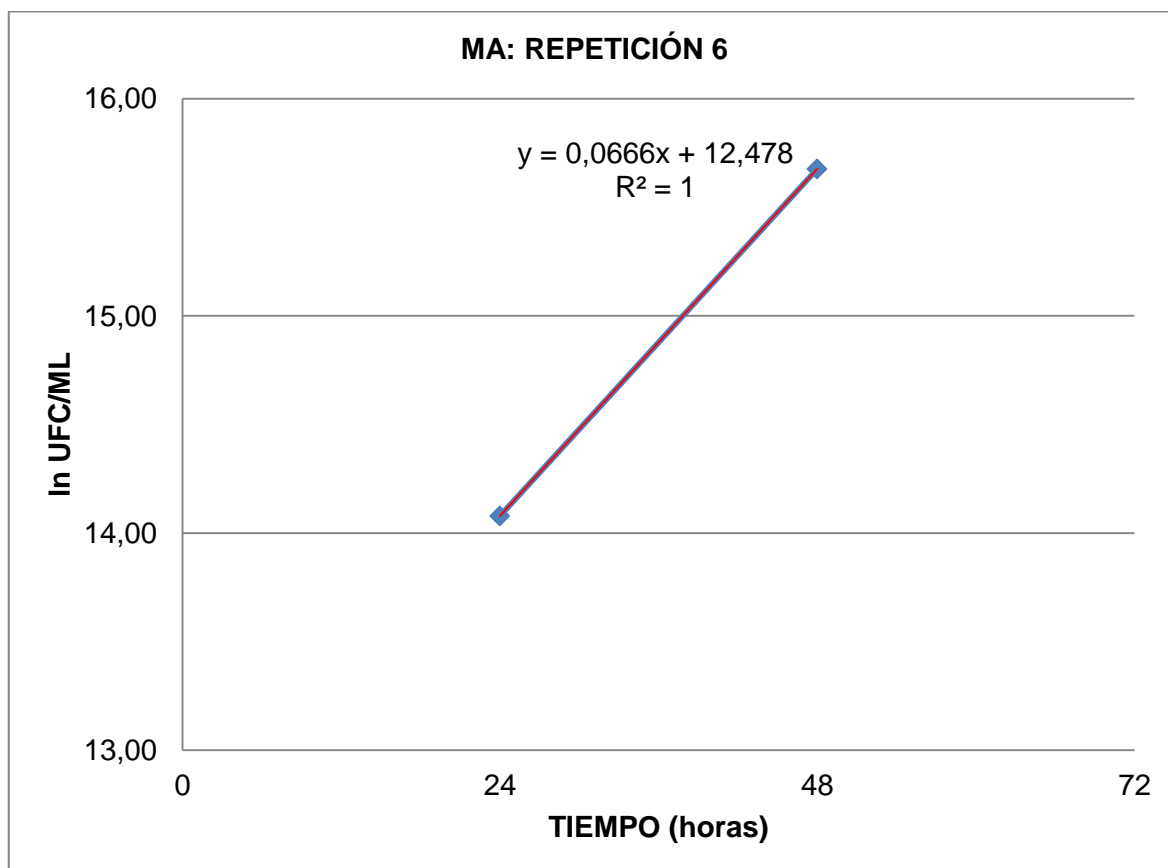
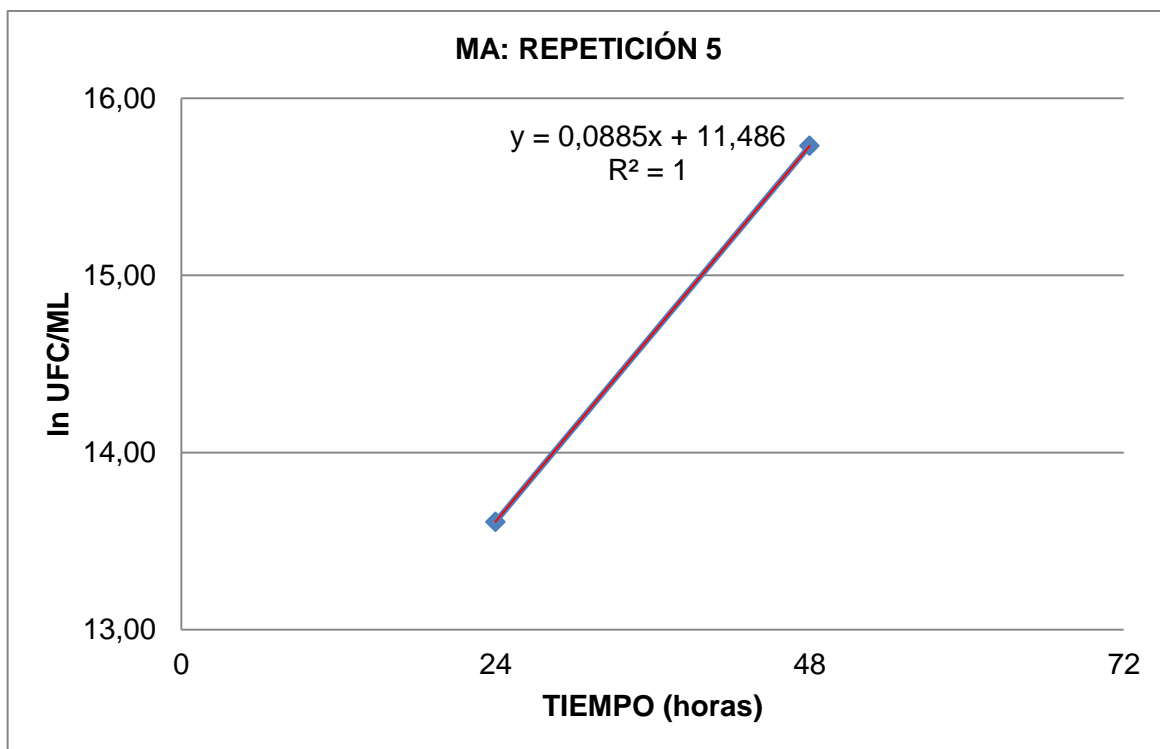




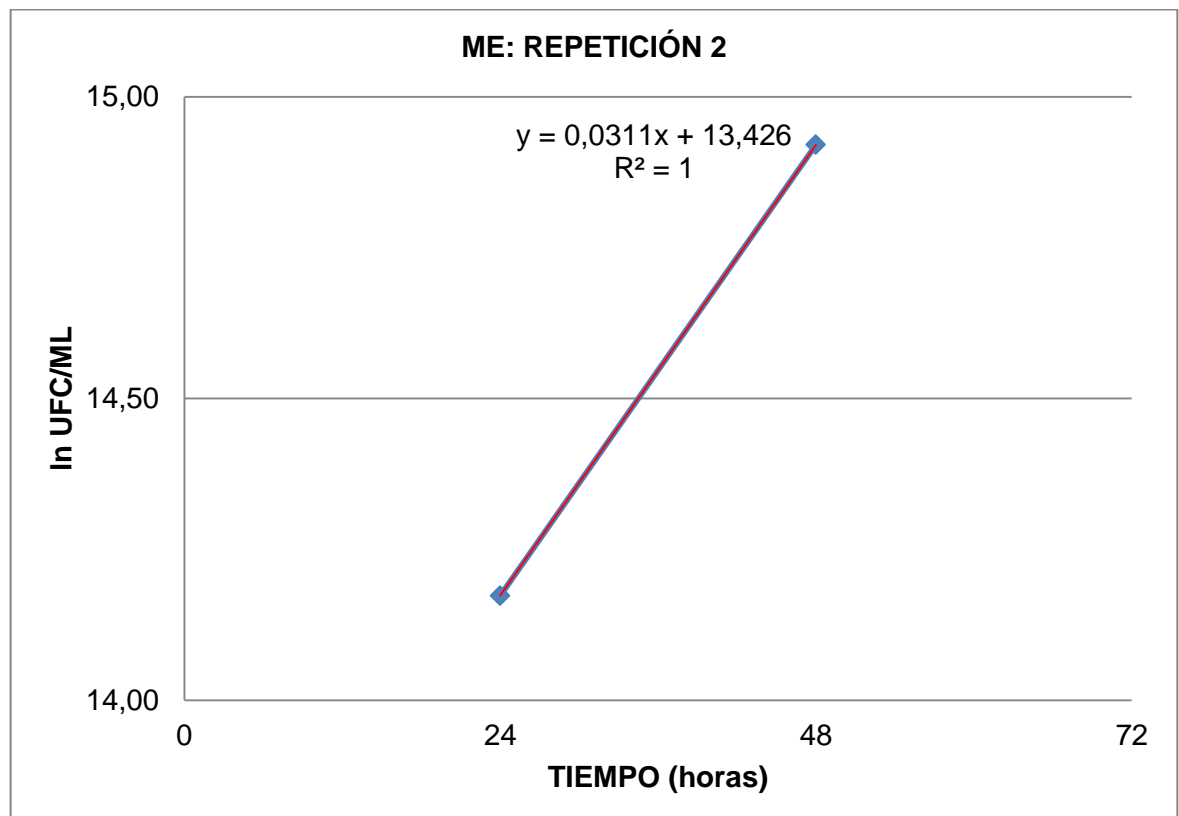
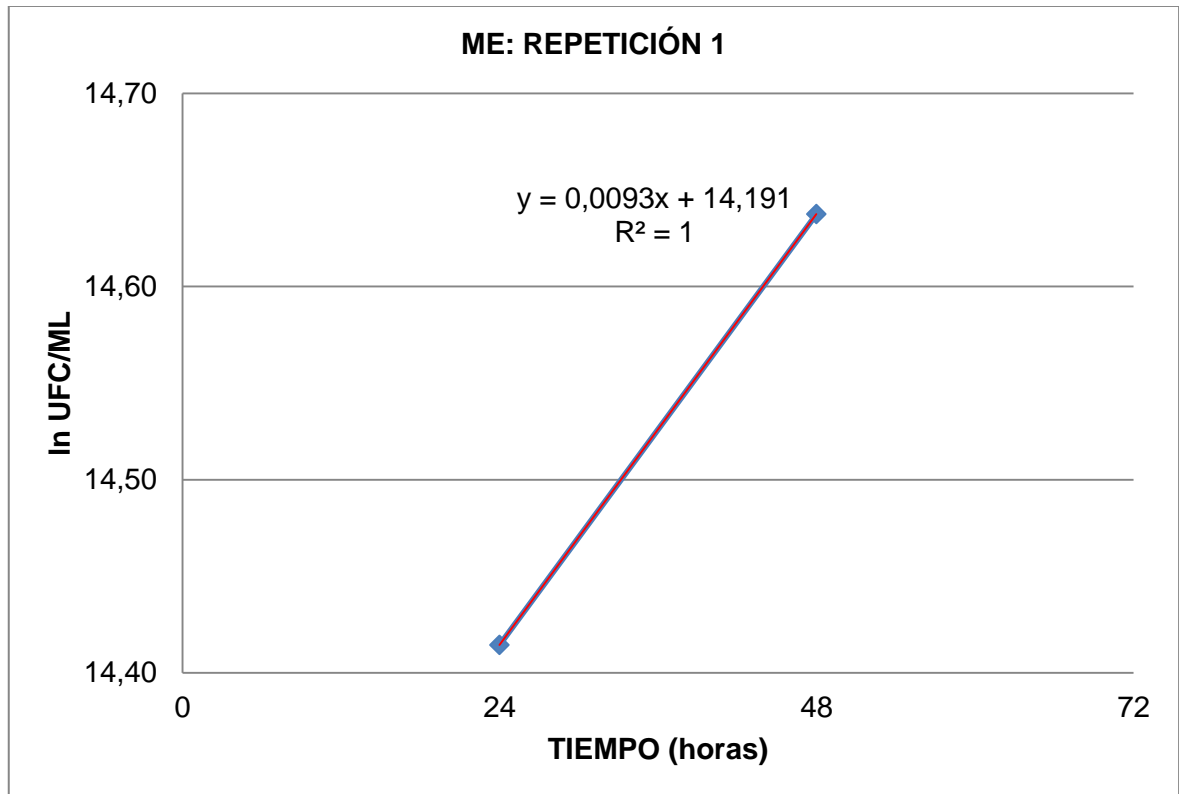
## MELAZA EN AGITACIÓN (6 REPETICIONES)

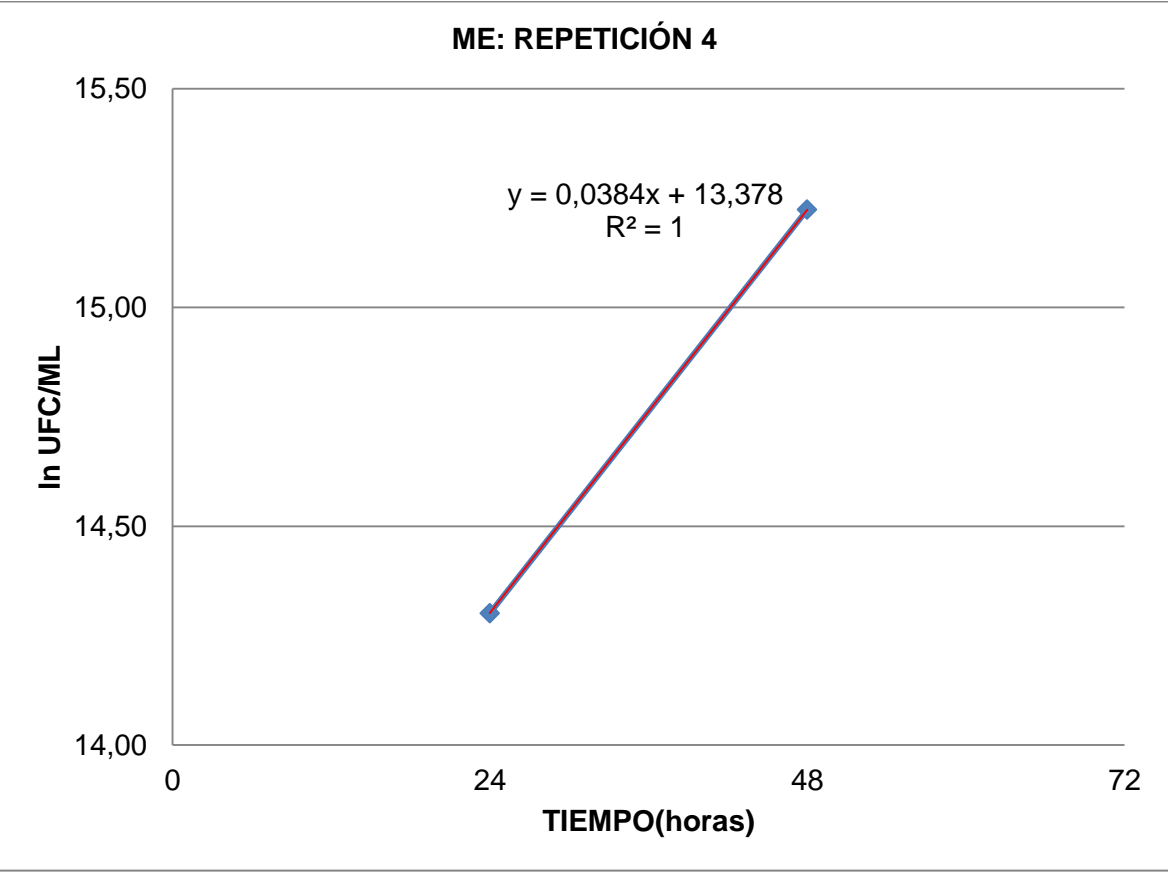
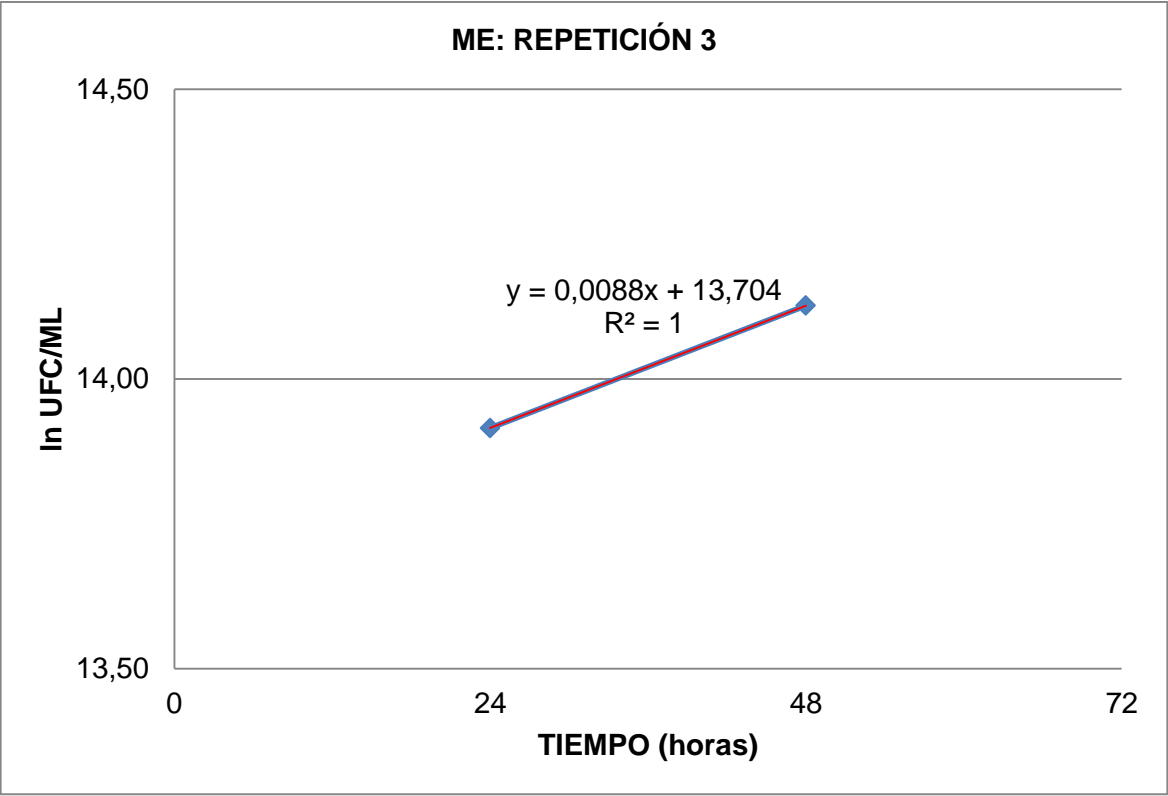


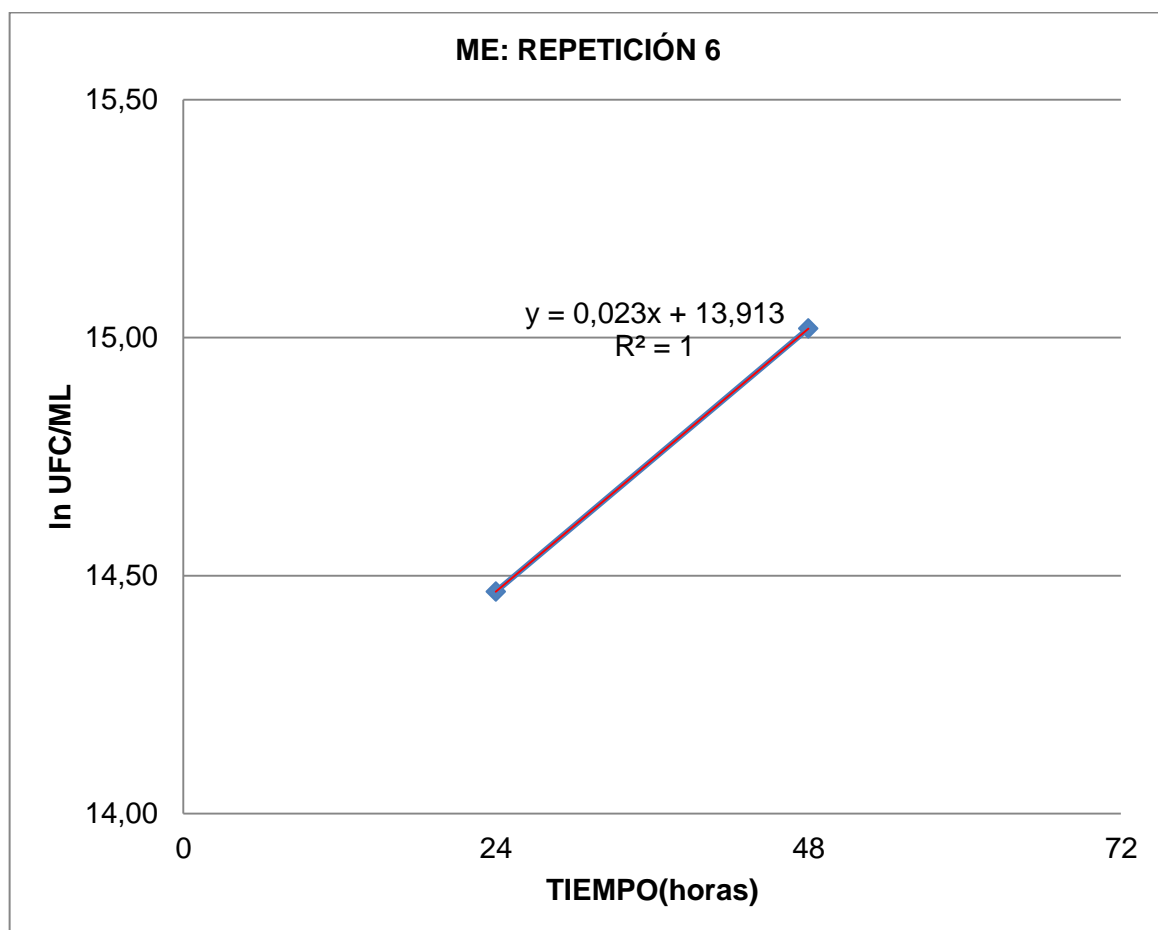
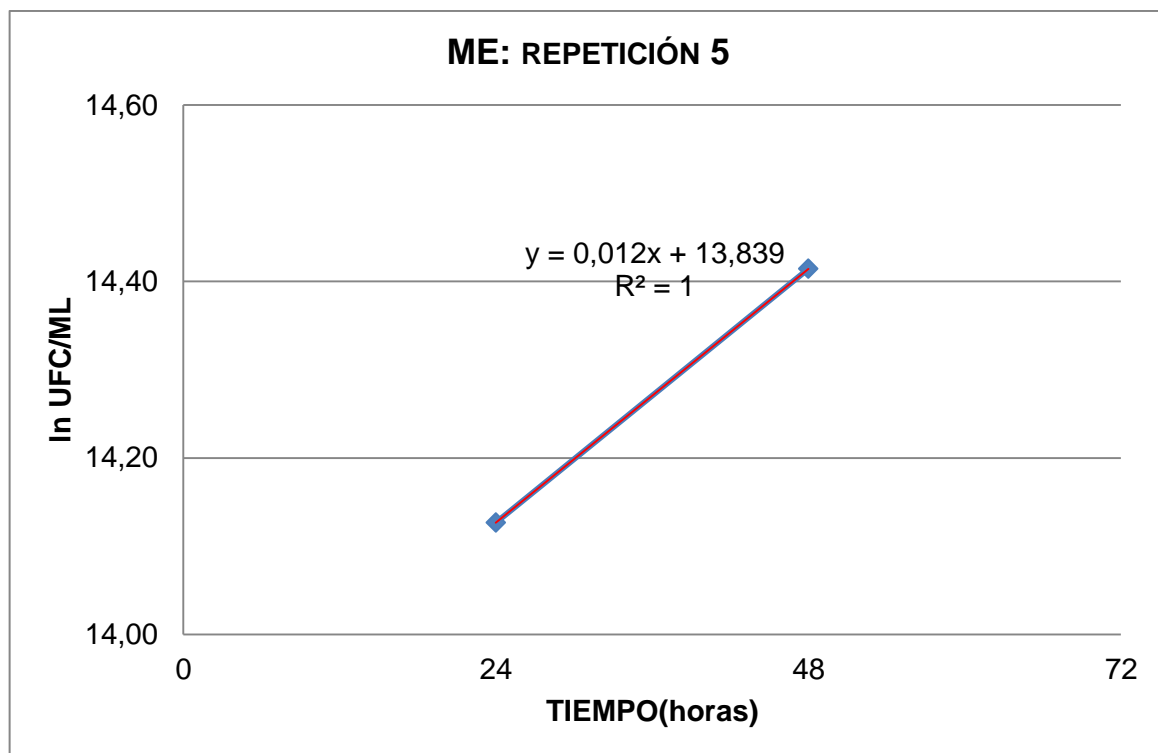




## MELAZA ESTÁTICO (6 REPETICIONES)



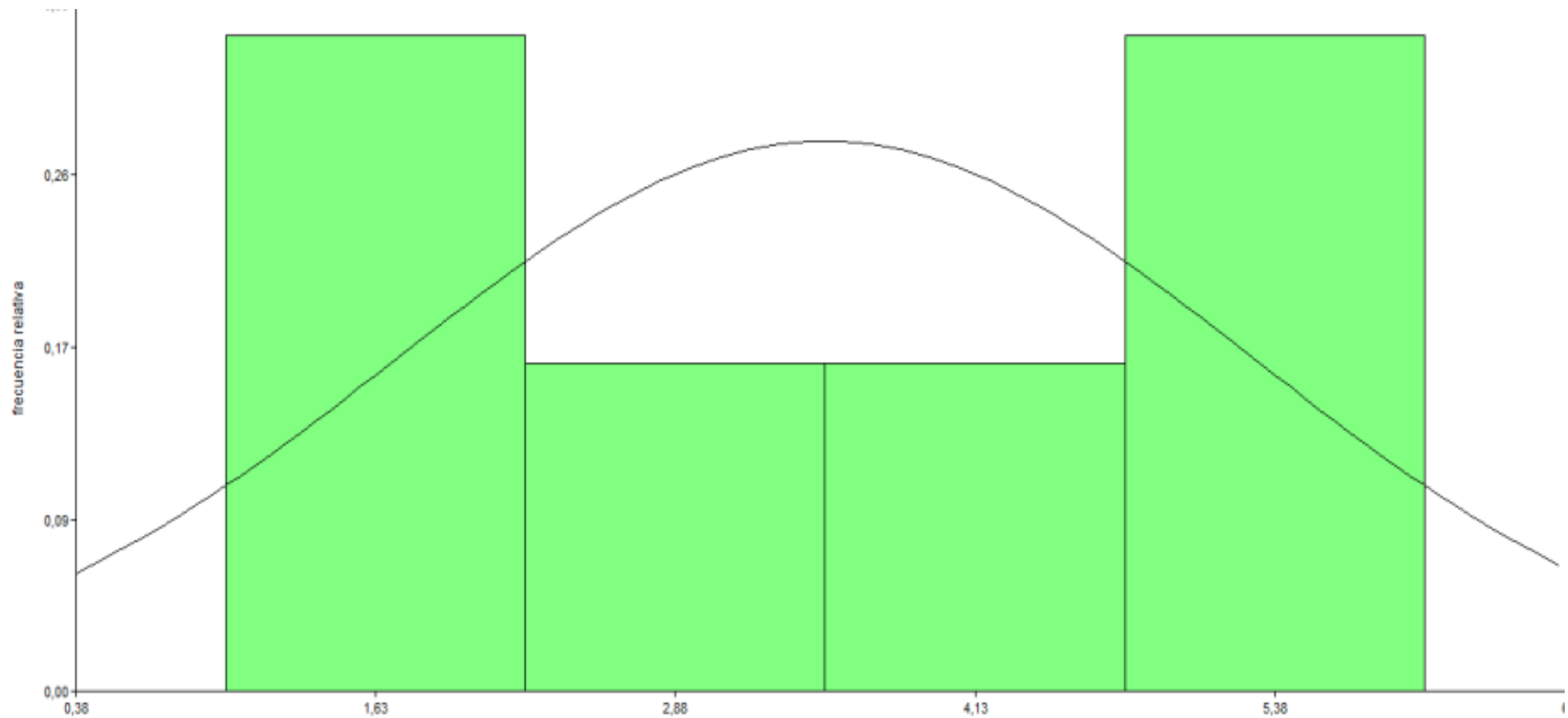




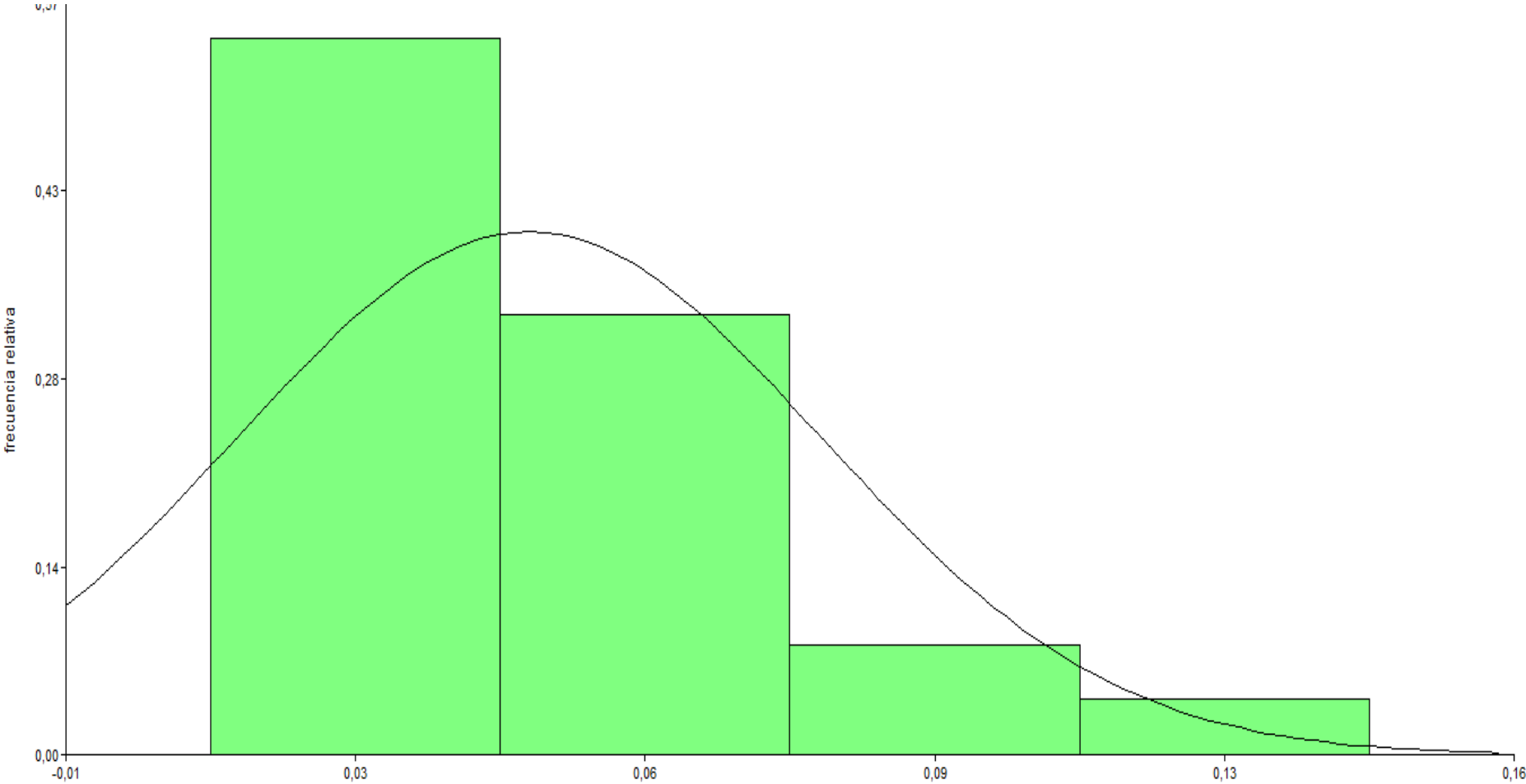


Anexo 7: Histogramas de frecuencia que muestran la no normalidad de los datos de cada variable de estudio, obtenidos mediante el programa estadístico Infostat Version Libre 2016.

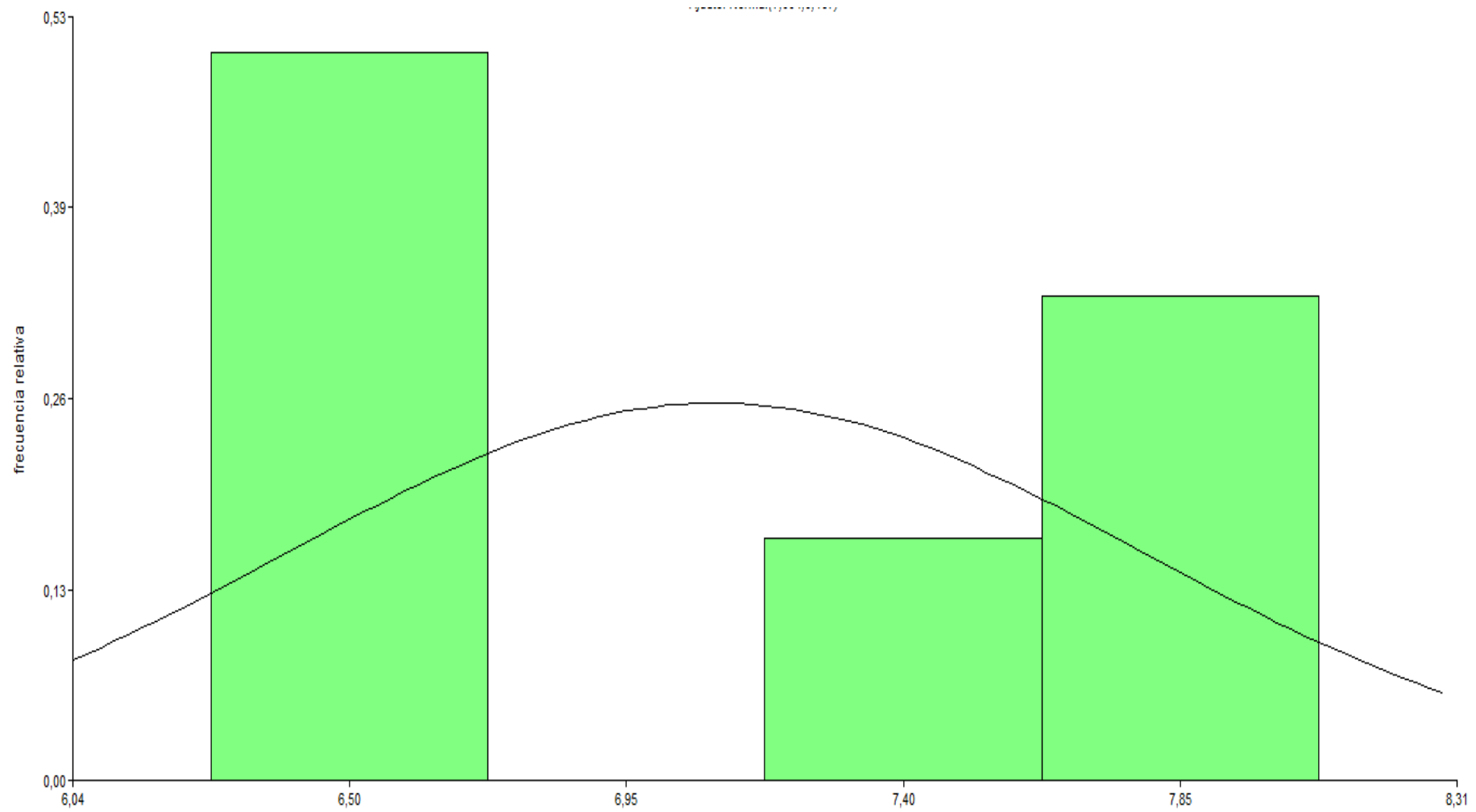
### HISTOGRAMA DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO



HISTOGRAMA DE LA VIABILIDAD



## HISTOGRAMA DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA



Anexo 8: Costos de produccciondel uso de distintos sustratos para el desarrollo de biomasa bacteriana, proyectados para un año, a escala piloto (50 Lt)

#### A. EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Mes	Días laborados	Producción (g)
Enero	20	7200
Febrero	21	7560
Marzo	21	7560
Abril	21	7560
Mayo	21	7560
Junio	22	7920
Julio	21	7560
Agosto	23	8280
Septiembre	22	7920
Octubre	21	7560
Noviembre	22	7920
Diciembre	22	7920
<b>TOTAL</b>	<b>257</b>	<b>92520</b>

#### B. ROL DE PAGOS

CARGO	CANTIDAD	SUELDO	10mo 3er sueldo	10mo 4to sueldo	FONDOS DE RESERVA	VACACIONES	APORTE PATRONAL	TOTAL MES	TOTAL AÑO
<b>Área de producción</b>									
<b>MANO DE OBRA DIRECTA</b>									
OBRERO 1	1,00	366,00	30,50	30,50	30,50	15,25	44,47	517,22	6206,63
OBRERO 1	1,00	366,00	30,50	30,50	30,50	15,25	44,47	517,22	6206,63
SUBTOTAL	2,00	732,00	61,00	61,00	61,00	30,50	88,94	1034,44	12413,26
<b>MANO DE OBRA INDIRECTA</b>									
TECNICO DE PRODUCCIÓN	1,00	850,00	70,83	30,50	70,83	35,42	103,28	1160,86	13930,30
SUBTOTAL	1,00	850,00	70,83	30,50	70,83	35,42	103,28	1160,86	13930,30
								<b>TOTAL</b>	<b>26343,56</b>

## C. MAQUINARIAS Y EQUIPOS DE PRODUCCIÓN

MAQUINARÍA Y EQUIPOS DE PRODUCCIÓN			
	Cantidad	Costo	Total
<b>MAQUINARIA</b>			
Biorreactor 50 L de capacidad	1	6000	6000
Cuarto de recepción	1	12000	12000
Cuarto de fermentación	1	12000	12000
Liofilizador	1	6000	6000
selladora de vacío	1	2200	2200
Cuarto de almacenamiento	1	12000	12000
<b>SUBTOTAL</b>			50200
<b>EQUIPOS</b>			
Refrigerador	2	500	1000
Autoclave	1	445	445
Ozonificador	2	200	400
Lavabo	1	700	700
Tanques de almacenamiento 50 Lt	2	500	1000
Bomba	1	300	300
Balanza analítica	1	120	120
Manguera	1	50	50
<b>SUBTOTAL</b>			4015
<b>TOTAL</b>			<b>54215</b>

D. COSTO DE MATERIA PRIMA PARA EL TRATAMIENTO LA Y LE

COSTOS DE PRODUCCION MATERIA PRIMA E INSUMOS				
DETALLES	Unidad	Precio	Cantidad	TOTAL COSTOS
Lactosuero	Lt	0,05	91779,840	4588,99
Inóculo	g	2,40	46,26	111,02
Fosfato de amonio	g	0,02	740,16	14,80
<b>TOTAL MATERIALES DIRECTOS</b>				<b>4714,82</b>

E. COSTO DE MATERIA PRIMA PARA EL TRATAMIENTO MA Y ME

COSTOS DE PRODUCCION MATERIA PRIMA E INSUMOS				
DETALLES	Unidad	Precio	Cantidad	TOTAL COSTOS
Melaza	Lt	0,35	7401,60	2590,56
Inóculo	mg	2,40	46,26	111,02
Agua destilada	Lt	0,35	84193,20	29467,62
Fosfato de amonio	ml	0,02	925,20	18,50
<b>TOTAL MATERIALES DIRECTOS</b>				<b>32187,71</b>

F. COSTOS INDIRECTOS DE PRODUCCIÓN

<b>COSTOS INDIRECTOS DE PRODUCCION</b>			
<b>MANO DE OBRA INDIRECTA</b>			
DESCRIPCION	Cantidad	TOTAL MES	TOTAL AÑO
Técnico de producción	1,00	1160,86	13930,30
<b>Subtotal</b>			13930,30
<b>Materiales Indirectos</b>			
DESCRIPCION	Cantidad	Valor unitario	TOTAL
Fundas para empacar prod. Liofilizado	1542,00	0,50	771,00
<b>Subtotal</b>			771,00
<b>DEPRECIACIONES</b>			
DESCRIPCION	Valor	%	TOTAL
MAQUINARIAS Y EQUIPO	54215,00	10,00	5421,50
<b>Subtotal</b>			4669,00
<b>MANTENIMIENTO Y REPARACION</b>			
MAQUINARIAS Y EQUIPO	54215,00	2,00	1084,30
<b>Subtotal</b>			1084,30
<b>GASTOS GENERALES</b>			
ESPÁTULAS	2,00	2,00	4,00
ALCOHOL ANTISÉPTICO	1,00	2,50	2,50
BOTAS DE CAUCHO	2,00	12,00	24,00
MANDIL Y OVEROL	2,00	18,00	36,00
COFIA Y MASCARILLA	4,00	1,50	6,00
GUANTES (Caja 100 unidades)	8,00	8,25	66,00
PIPETAS 5m, 10ml	10,00	0,50	5,00
PIPETIÓMETRO	2,00	1,00	2,00
VASOS DE PRECIPITACIÓN 20ml, 500 ml	5,00	5,00	25,00
GRADILLAS	2,00	2,50	5,00
TUBOS DE ENSAYO CON TAPA	20,00	0,50	10,00
ENERGÍA ELÉCTRICA (kw/h)	10318,46	0,1	1031,8464
Agua (metro cúbico)	360	1,7	612
<b>Subtotal</b>			1829,35
<b>TOTAL COSTOS INDIRECTOS</b>			22283,95

### G. CONSUMO DE ENERGÍA ELÉCTRICA

<b>MAQUINARIA</b>	<b>KW/Día</b>	<b>KW/Mes</b>	<b>KW/Año</b>
Autoclave	2,4	72	864,00
Refrigerador	2,4	72	864,00
Liofilizador	5,9656	178,968	2147,62
Selladora de vacío	5,9656	178,968	2147,62
Biorreactor	5,9656	178,968	2147,62
Bomba	5,9656	178,968	2147,62
<b>TOTAL</b>			10318,46

### H. MANO DE OBRA DIRECTA

<b>MANO DE OBRA DIRECTA</b>			
<b>CARGO</b>	<b>Cantidad</b>	<b>TOTAL MES</b>	<b>TOTAL AÑO</b>
OBRERO 1	1	517,22	6206,63
OBRERO 2	1	517,22	6206,63
<b>TOTAL MANO DE OBRA DIRECTA</b>			12413,26